

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ  
ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

**ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ ΕΥΚΑΡΥΩΤΩΝ ΤΗΣ ΛΙΜΝΗΣ  
ΚΑΡΛΑΣ»**

**Νικόλαος Τρίκολας**

**ΒΟΛΟΣ 2014**

**«Μικροσκοπική αναγνώριση ευκαρυωτών της λίμνης Κάρλας.»**

**Τριμελής εξεταστική επιτροπή:**

- 1) **Βερίλλης Παναγιώτης**, Λέκτορας, Χρήση Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας και Ανάλυσης Εικόνας στην Ιστολογία, Τμήμα Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, *Επιβλέπων*,
- 2) **Κορμάς Κωνσταντίνος**, Αναπληρωτής Καθηγητής, Οικολογία Υδρόβιων Μικροοργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, *Μέλος*,
- 3) **Μουστάκα-Γουνή Μαρία**, Καθηγήτρια, Υδροβοτανική-Υδρο-οικολογία, Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, *Μέλος*.



**ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

*Θα ήθελα να ευχαριστήσω  
όλους όσους στάθηκαν δίπλα  
μου τα πανέμορφα φοιτητικά  
μου χρόνια, αγαπητούς φίλους  
και συγγενείς.*

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η λίμνη Κάρλα παλαιότερα είχε έκταση περίπου 180 τ. χλμ, βρισκόταν νοτιο-ανατολικά της Λάρισας, κοντά στις βόρειες πλαγιές του Πηλίου, στα όρια των Νομών Λαρίσης και Μαγνησίας, ωστόσο όμως αποξηράνθηκε το 1962. Τη δεκαετία του 1990 αποφασίστηκε η επανασύσταση της λίμνης Κάρλας και άρχισε η υλοποίηση ενός από τα μεγαλύτερα έργα της Ελλάδος. Η νέα λίμνη Κάρλα θα έχει έκταση περίπου 38 τ. χλμ. στρεμμάτων.

Σε ένα υδάτινο περιβάλλον με γλυκό νερό που βρίσκεται εν τη γενέσει του, όπως η λίμνη Κάρλα, οι συνθήκες που επικρατούν σε φυσικό, χημικό και βιολογικό επίπεδο ποικίλουν και μπορεί εύκολα να διαταραχτεί η ισορροπία που δημιουργείται μεταξύ των μικροοργανισμών, με αποτέλεσμα να παρατηρούνται διαφορές και στα ευκαρυωτικά μικροβιακά είδη που διαβιούν εκεί. Έτσι λοιπόν, είναι αναγκαία η ορθή και ακριβής ταξινομική αναγνώριση και η χωροχρονική δυναμική των πληθυσμών των ευκαρυωτικών μικροοργανισμών, προκειμένου να δημιουργηθεί μια ισορροπία στο οικοσύστημα.

Εποχικές δειγματοληψίες νερού της λίμνης Κάρλας, έλαβαν χώρα τους μήνες Νοέμβριο, Δεκέμβριο και Ιανουάριο του 2010-2011, και με τη βοήθεια ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σαρώσεως (scanning electron microscopy, S.E.M.) μελετήθηκαν ποιοτικά οι ευκαρυωτικοί μικροοργανισμοί που περιέχονται στην υδάτινη στήλη της λίμνης.

Το νερό της δειγματοληψίας, μονιμοποιήθηκε σε τελική συγκέντρωση 2,5% γλουταραλδεϋδη και διηθήθηκε σε ηθμούς μεμβράνης PTFE με πόρους διαμέτρου 0,2  $\mu\text{m}$  σε κανό χαμηλής πίεσης (<100mm στήλης Hg). Από τους ηθμούς, αφαιρέθηκαν τμήματα, επιμεταλλώθηκαν και τοποθετήθηκαν στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης προς παρατήρηση.

## VII

Στα περισσότερα υδάτινα περιβάλλοντα, τα κυρίαρχα φωτότροφα είναι μικροοργανισμοί, όπως επιβεβαιώθηκε και με την παρατήρηση των δειγμάτων. Επικρατέστεροι μικροοργανισμοί ήταν τα κυανοβακτήρια (όλα νηματωειδή), τα οποία και ήταν τα αφθονότερα τον μήνα Ιανουάριο, ενώ τα διάτομα, τα ευγληνόφυτα και οι μύκητες, ήταν παρόντα και στους τρεις μήνες της δειγματοληψίας.

**Λέξεις-κλειδιά:** Κάρλα, ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (S.E.M.), ευκαριωτικοί μικροοργανισμοί.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.Εισαγωγικές έννοιες.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2.Η σημασία της μορφολογίας στην αναγνώριση μονοκύτταρων         μικροοργανισμών.....</b>	<b>3</b>
<b>1.3.Η συμβολή της σαρωτικής ηλεκτρονικής μικροσκοπίας στην         αναγνώριση.....</b>	<b>4</b>
<b>1.4.Ο σκοπός της εργασίας-μελέτης.....</b>	<b>6</b>
<b>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>8</b>
<b>2.1.Περιοχή μελέτης.....</b>	<b>8</b>
<b>2.1.1. Ιστορικά στοιχεία.....</b>	<b>8</b>
<b>2.1.2. Η λίμνη Κάρλα πρίν την αποξήρανση.....</b>	<b>9</b>
<b>2.1.3. Το έργο της επανασύστασης.....</b>	<b>11</b>
<b>2.1.4. Το σημείο δειγματοληψίας.....</b>	<b>12</b>
<b>2.2.Δειγματοληψία.....</b>	<b>12</b>
<b>2.3.Επεξεργασία δειγμάτων.....</b>	<b>14</b>
<b>2.3.1. Παρασκευή δειγμάτων για ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης                 (S.E.M.).....</b>	<b>14</b>
<b>2.3.2. Παρατήρηση δειγμάτων σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης                 (S.E.M.).....</b>	<b>15</b>
<b>2.4.Επεξεργασία φωτογραφιών.....</b>	<b>17</b>
<b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>19</b>
<b>3.1.Αβιοτικοί παράγοντες.....</b>	<b>19</b>
<b>3.2.Ευκαρυωτικοί οργανισμοί.....</b>	<b>20</b>
<b>3.2.1. Βασίλειο Plantae.....</b>	<b>21</b>
<b>3.2.2. Βασίλειο Protista.....</b>	<b>26</b>
<b>3.2.2.1.Συνομοταξία.....</b>	<b>27</b>
<b>3.2.2.2.Συνομοταξία.....</b>	<b>30</b>
<b>3.2.2.3.Συνομοταξία.....</b>	<b>33</b>
<b>3.2.2.4.Συνομοταξία.....</b>	<b>36</b>
<b>3.2.2.5.Συνομοταξία.....</b>	<b>37</b>
<b>3.2.2.6.Συνομοταξία.....</b>	<b>38</b>
<b>3.2.3. Βασίλειο Fungi.....</b>	<b>40</b>
<b>3.3.Προκαρυωτικοί οργανισμοί.....</b>	<b>42</b>
<b>3.4.Άλλες μελέτες για την λίμνη Κάρλα.....</b>	<b>48</b>
<b>4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>54</b>
<b>5. Ελληνόφωνη.....</b>	<b>54</b>
<b>6. Ξενόφωνη.....</b>	<b>56</b>
<b>7. Ηλεκτρονική.....</b>	<b>64</b>





## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1.Εισαγωγικές έννοιες

Η σημασία του φυσικού περιβάλλοντος στην υγεία του ανθρώπου και γενικά στην διατήρηση του οικοσυστήματος ήταν γνωστή από την εποχή του Ιπποκράτη (Μπαέβας 2011). Η καταστροφή και η ρύπανση του περιβάλλοντος αποτελεί ένα όξυ και σοβαρό διεθνές κοινωνικό υγειονομικό πρόβλημα.

Το ζήτημα της ρύπανσης του περιβάλλοντος δεν είναι καινούριο και ούτε προέκυψε ξαφνικά και αναπάντεχα. Η φύση είχε πάντοτε τους απαραίτητους μηχανισμούς, έτσι ώστε οτιδήποτε περιττό για τα ζώα, τα φυτά και τον άνθρωπο να μετατρέπεται μέσω διάφορων διεργασιών σε κάτι το οποίο δεν αποτελούσε πηγή κινδύνου για το οικοσύστημα (Σγούτζος 2007). Μέσω φυσικών χημικών αλλά και βιολογικών διεργασιών διατηρούνταν μια ισορροπία η οποία ήταν και είναι απαραίτητη για την ομαλή συμβίωση όλων των ζωντανών οργανισμών πάνω στην γη.

Οι μικροοργανισμοί αποτελούν τμήμα ενός τέτοιου μηχανισμού σε ένα οικοσύστημα, και σε ένα υδάτινο οικοσύστημα, όπως η Κάρλα, παίζουν σημαντικό ρόλο στην ισορροπία του, ειδικά όταν αυτό είναι εν τη γενέσει του.

Γενικά σε ένα οικοσύστημα, οι οργανισμοί χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με τον τρόπο που εξασφαλίζουν την τροφή τους αυτοί είναι οι παραγωγοί, οι καταναλωτές και οι αποικοδομητές. Στην πρώτη και τρίτη κατηγορία ανήκουν οι περισσότεροι μονοκύτταροι οργανισμοί στο φυσικό περιβάλλον (Μαυρικάκη και συν. 2009). Επιτελούν δηλαδή την παραγωγή ενέργειας σε ένα οικοσύστημα, και την ανακύκλωσή της, και γι' αυτό είναι σημαντική η μελέτη τους.

Ένα οικοσύστημα το οποίο είναι ανοιχτό (εκτεθημένο) σε ανθρωπογενείς δραστηριότητες, είναι ταυτόχρονα και ευάλωτο. Η ισορροπία που υπάρχει ως αυτούσια στα οικοσυστήματα τείνει να εξαλειφθεί παρουσία ανθρώπινων δραστηριοτήτων. Για τον λόγο αυτό δημιουργήθηκαν και οι προστατευόμενες περιοχές (Χατζηχαράλαμους και συν. 2003).

Οι προστατευόμενες περιοχές (Π.Π.) έχουν καθιερωθεί ως ένα από τα σημαντικότερα μέσα για την προστασία της ισορροπίας του περιβάλλοντος γενικά και της βιοποικιλότητας ιδιαίτερα (Παπακωσταντίνου & Σμπαρούνης 2008). Υπάρχουν πολλές κατηγορίες Π.Π., που διαφοροποιούνται ανάλογα με τον φορέα θεσμοθέτησης, (Unesco, Ε.Ε., Ελληνική κυβέρνηση, διεθνείς συνθήκες) αλλά και τη διαβάθμιση του προστατευταίου αντικειμένου ως προς την έκταση, το είδος των οικοσυστημάτων, τις κατηγορίες των ζωικών και φυτικών οργανισμών που χρήζουν προστασίας κ.α. (Χατζηχαράλαμους και συν. 2003).

Ένα από τα πιο φιλόδοξα ευρωπαϊκά προγράμματα για την προστασία τέτοιων φυσικών περιοχών και τοπίων ιδρύθηκε τον Μάιο του 1992. Το δίκτυο Natura 2000 αποτελεί ένα ευρωπαϊκό οικολογικό δίκτυο περιοχών, οι οποίες φιλοξενούν φυσικούς τύπους οικοτόπων και οικοτόπους ειδών που είναι σημαντικοί σε ευρωπαϊκό επίπεδο.

Στηρίζεται στις κοινοτικές οδηγίες για τους οικοτόπους (92/43/ΕΟΚ) (Τόπους Κοινοτικής Σημασίας (ΤΚΣ), Sites of Community Importance – SCI) και για τα πουλιά (79/409/ΕΟΚ) (Ζώνες Ειδικής Προστασίας (ΖΕΠ), Special Protection Areas - SPA). Η οδηγία του 1992 για τους οικοτόπους επιβάλλει σε κάθε χώρα της Ε.Ε. να ξεχωρίσει τις γεωγραφικές εκείνες περιοχές, που η σπουδαιότητα της οικολογικής τους ταυτότητας τις καθιστά τόπους ευρωπαϊκής (περιβαλλοντολογικής) σημασίας. Επιπλέον, ζητά από τα κράτη-μέλη να

καταρτίσουν διαχειριστικά σχέδια για τις συγκεκριμένες περιοχές. Τα σχέδια αυτά πρέπει να συνδυάζουν αρμονικά τη διατήρηση της άγριας πανίδας και χλωρίδας με τις οικονομικές και κοινωνικές δραστηριότητες και να είναι ενταγμένα σε στρατηγική βιώσιμης ανάπτυξης. Οι τοποθεσίες αυτές που εντάσσονται στο δίκτυο Natura 2000, αποτελούν τον ακρογωνιαίο λίθο της πολιτικής της Ε.Ε. για τη διατήρηση της φύσης (ΥΠΕΚΑ 2009).

Η Ελλάδα έχει χαρακτηρίσει μέχρι σήμερα 202 Ζώνες Ειδικής Προστασίας (ΖΕΠ) και 241 Τόπους Κοινοτικής Σημασίας (ΤΚΣ), εκ των οποίων οι δύο είναι ακόμη προτεινόμενοι (Ε.Κ. Αθήνα 2011). Μια από αυτές τις προστατευόμενες περιοχές από το δίκτυο Natura 2000 στην Ελλάδα, είναι και η λίμνη Κάρλα ή αλλιώς λίμνη Βοιβήδα (παλαιότερα), η οποία σε συνδυασμό με τις περιοχές Μαυροβούνι, Κεφαλόβρυσο Βελεστίνου και Νεοχώρι, αποτελούν τον κωδικό GR1420004 του δικτύου Natura 2000.

## 1.2.Μορφολογική αναγνώριση μονοκύτταρων μικροοργανισμών

Υπάρχουν πολλές τεχνικές αναγνώρισης, ταυτοποίησης και ταξινόμησης μικροοργανισμών, ωστόσο καμία από τις μεθόδους αν εφαρμοστεί μόνη της αποκλειστικά, δε μπορεί να έχει ικανοποιητικό αποτέλεσμα. Τεχνικές όπως η αναγνώριση (ταυτοποίηση) μέσω οπτικού μικροσκοπίου, ηλεκτρονικού μικροσκοπίου, βιοχημικές αναλύσεις, αναλύσεις αποτυπώματος DNA, PCR, αναλύσεις μέσω αλληλουχίας RNA και διάφορες άλλες μέθοδοι μπορούν να ταυτοποιήσουν και να ταξινομήσουν διάφορα είδη μικροοργανισμών, αλλά όχι όλα, και σπάνια ικανοποιητικά, όταν εφαρμοστούν από μόνες τους (Campden 2012). Έτσι, σε περιπτώσεις λιμνών και (γενικότερα) οικοσυστημάτων, στη βιομηχανία τροφίμων, αλλά και στη βιομηχανία φαρμάκων, επιλέγεται να

χρησιμοποιούνται τουλάχιστον δύο αναλύσεις εκ των αναφερθέντων, προκειμένου αρχικώς να αναγνωριστούν τα γένη των μικροοργανισμών που υπάρχουν, εν συνεχεία να αναγνωριστούν τα είδη και συμπερασματικά οι ιδιότητες του κάθε είδους (Bergey 2013).

### 1.3. Η συμβολή της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης στην αναγνώριση

Όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενη ενότητα, υπάρχουν αρκετά προβλήματα στην αναγνώριση μικροσκοπικών ευκαρυωτών, κυρίως με τη χρήση απλού μικρόσκοπιου (Mc Mullan 1995). Κάποια από αυτά τα προβλήματα εξαλείφει η χρήση του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (S.E.M.) καθώς το μεγαλύτερο πλεονέκτημά του έναντι των κλασικών μικροσκοπίων, είναι η κατά πολύ μεγαλύτερη μεγέθυνση που παρέχει σε σχέση με τα κοινά μικροσκόπια φωτός, φτάνοντας το μισό εκατομμύριο φορές, ενώ τα μικροσκόπια φωτός μόλις που ξεπερνούν τις δύο χιλιάδες φορές (Mc Mullan 1953). Έτσι διακρίνονται περισσότερες λεπτομέρειες στους υπό μελέτη μικροοργανισμούς και η αναγνώρισή τους γίνεται ευκολότερη.

Ένα άλλο μεγάλο πλεονέκτημα είναι ότι ακόμη και στις μικρές μεγεθύνσεις, όπου οι δύο τύποι μικροσκοπίου (S.E.M. και οπτικό) αλληλοεπικαλύπτονται, το S.E.M. έχει περίπου εκατό φορές (και πάνω) εστιακό βάθος μεγαλύτερο από το κοινό μικροσκόπιο φωτός. Αυτό σημαίνει ότι μπορούμε να έχουμε καθαρότερη εικόνα σε πολλά επίπεδα βάθους, χωρίς να χρειάζονται συνεχείς αλλαγές στην εστίαση. Αντίθετα, με το οπτικό μικροσκόπιο θα πρέπει να μεταβάλουμε διαρκώς την εστίαση των φακών σε διαφορετικά επίπεδα, και με αυτόν τον τρόπο χάνουμε τη συνοχή της εικόνας και των πληροφοριών που βρίσκονται εκτός το εστιακού επιπέδου (Zworykin et al. 1942).

Τελευταίο, αλλά εξίσου σημαντικό πλεονέκτημα της χρήσης ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης στη μορφολογική αναγνώριση μικροοργανισμών, είναι ότι με το S.E.M. λαμβάνουμε εκπομπές, όπως ακτίνες X, αλλά και πληροφορίες, όπως χημική σύσταση κ.α., που προκύπτουν από τα οπισθοσκεδαζόμενα και δευτερογενή ηλεκτρόνια (Oakley 1982). Οι πληροφορίες στην περίπτωση των δευτερογενών ηλεκτρονίων προκύπτουν από τον ιονισμό που υφίστανται τα πρωτογενή ηλεκτρόνια στη μάζα του εξεταζόμενου δείγματος. Μετά τον ιονισμό τα μόρια είτε αλλοιώνονται μόνιμα, είτε τείνουν να γυρίσουν στην αρχική τους κατάσταση απελευθερώνοντας ηλεκτρόνια, δευτερογενή ηλεκτρόνια, των οποίων η ενέργεια (περίπου 50 eV) (Peters 1982) χρησιμοποιείται στην δημιουργία του ειδώλου που παρατηρείται στις οθόνες των ηλεκτρονικών μικροσκοπίων σαρώσεως.

Παρομοίως χρησιμοποιούνται και τα οπισθοσκεδαζόμενα ηλεκτρόνια στη δημιουργία του ειδώλου· η διαφορά είναι ότι τα οπισθοσκεδαζόμενα ηλεκτρόνια προκύπτουν από τα ηλεκτρόνια της δέσμης που εισέρχονται στο προς εξέταση δείγμα, σκεδάζονται και εξέρχονται από αυτό, συνήθως με μικρότερη ενέργεια από αυτή της εισαγωγής τους (Murata 1974). Η ενέργεια αυτή είναι ανάλογη με τον αριθμό και το είδος των σκεδασμών που υπέστησαν τα ηλεκτρόνια κατά την διάρκεια της αλληλεπίδρασής τους με το δείγμα.

Τέλος, οι ακτίνες X προέρχονται από την αποδιέγερση διεγερμένων ατόμων του δείγματος, και είναι χαρακτηριστικές των ατόμων από τα οποία προέρχονται. Έτσι, με την ανίχνευσή τους μπορούμε να γνωρίζουμε την φύση των υλικών που σαρώνονται ταυτόχρονα με την χωρική και ποσοτική κατανομή τους (Goldstein al. 2003).

Τα μειονεκτήματα της χρήσης του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης, είναι κυρίως δύο. Αρχικώς δεν επιτρέπει την εξέταση μονωτικών υλικών, εκτός από την περίπτωση μερικών ειδικών συνθηκών χαμηλού δυναμικού επιτάχυνσης και έντασης της ηλεκτρονιακής δέσμης (Reimer 1985). Επίσης δεν επιτρέπει την εξέταση υγρών δειγμάτων, και γενικά αντικειμένων που παράγουν αέρια (εξάχνωση) ή υφίστανται αποξήρανση. Και τέλος το κόστος λειτουργίας του, είναι πολύ υψηλό.

#### 1.4.Σκοπός της εργασίας-μελέτης

Στα περισσότερα υδάτινα περιβάλλοντα, τα κυρίαρχα φωτότροφα είναι μικροοργανισμοί. Συνήθως επικρατέστερα είναι τα κυανοβακτήρια και τα φύκη (φυτοπλαγκτόν), τα οποία, ως πρωτογενείς παραγωγοί, είναι άμεσα συνδεδεμένοι με την αρχική παραγωγή οργανικής ύλης και συνεπώς με την ανάπτυξη άλλων οργανισμών, ενώ σε ανοξικές περιοχές επικρατούν τα μη οξυγονοπαραγωγικά φωτότροφα.

Σε ένα υδάτινο περιβάλλον με γλυκό νερό, όπως η Κάρλα, οι συνθήκες που επικρατούν σε φυσικό, χημικό και βιολογικό επίπεδο, ποικίλλουν, με αποτέλεσμα να παρατηρούνται διαφορές και στα ευκαρυωτικά μικροβιακά είδη που διαβιούν εκεί. Σε αυτό το υδάτινο περιβάλλον, που βρίσκεται εν τη γενέσει του, μπορεί εύκολα να διαταραχτεί η ισορροπία που δημιουργείται μεταξύ των μικροοργανισμών και έτσι λοιπόν είναι αναγκαία η παρακολούθηση της πορείας, της εξάπλωσης και της ανάπτυξης των ευκαρυωτικών μικροοργανισμών, προκειμένου να δημιουργηθεί μια ισορροπία στο οικοσύστημα.

Εποχικές δειγματοληψίες νερού της λίμνης Κάρλας έλαβαν χώρα για την εργασία αυτή και με την βοήθεια σαρωτικού ηλεκτρονικού μικροσκοπίου

(S.E.M.) μελετήθηκαν ποιοτικά οι ευκαρυωτικοί μικροοργανισμοί που περιέχονται στην υδάτινη στήλη της λίμνης προκειμένου να ταυτοποιηθούν και να αναγνωριστούν οι μικροοργανισμοί που συλλέχθηκαν ώστε να υπάρξει μια καθαρή εικόνα για τους μικροοργανισμούς, και την τοξικότητά τους στην λίμνη Κάρλα καθώς και να μελετηθεί η πορεία της αποκατάστασης της με μελλοντικό σκοπό την δημιουργία ενός οικοσυστήματος αντίστοιχο του φυσικού που προϋπήρχε στην περιοχή την δεκαετία του '50.



## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1.Περιοχή μελέτης (λίμνη Κάρλα)

#### 2.1.1. Ιστορικά στοιχεία

Σύμφωνα με τον Ananiadis (1956), η λίμνη Κάρλα ή αλλιώς λίμνη Βοιβηίδα (παλαιότερα), καθώς και πολλές λίμνες στην ελληνική επικράτεια, σχηματίστηκαν κατά την κενozoϊκή περίοδο από πολλούς και μεγάλους σεισμούς. Κατά την νεολιθική εποχή το βάθος της λίμνης κυμαινόταν απο 50-64m (Apostolou 1979), βάθος το οποίο διατηρήθηκε και παρατηρήθηκε και πολύ αργότερα, εν έτει 1921 , όπου το βάθος ήταν 50,10m, ενώ η επιφάνεια της λίμνης το 1945 ήταν 78,35Km<sup>2</sup> (Moumou et al. 2010).

Η πρώτη επίσημη μελέτη που αφορούσε την λίμνη Κάρλα, έγινε με την απελευθέρωση της Θεσσαλίας από τους Τούρκους το 1878 από την τότε γαλλική αποστολή, με σκοπό την αύξηση της παραγωγικότητας της λεκάνης. Από το 1911 μέχρι το 1954 έγιναν αρκετές μελέτες που αφορούσαν την λίμνη, κυρίως όμως από εταιρείες όπως των “J. Jackson, Macdonald και Boot”, και αφορούσαν μελέτες για αρδρευτικά αλλά και αντιπλημμυρικά έργα. Την περίοδο 1911-1913 ο Ιταλός μηχανικός J. Mobile εκπόνησε ένα αντιπλημμυρικό έργο που περιλάμβανε αποστράγγιση ενός μέρους της λίμνης και τη χρησιμοποίηση του «στεγνού» πλέον από νερά, κομματιού για την ανάσχεση των πλημμύρων, ενώ από την υπόλοιπη λίμνη θα τροφοδοτούνταν με νερό οι καλλιέργειες γύρω της.

Το 1954 και το 1959 έγιναν δύο μελέτες, από τους Παπαδάκη και Νικολαΐδη αντίστοιχα, που η πρώτη αφορούσε τη μερική αποστράγγιση της λίμνης, ενώ η δεύτερη την ολική προς τον Παγασητικό κόλπο, και συμπεριλάμβαναν την δημιουργία τάφρων. Τελικά η αποστράγγιση έγινε με βάση την μελέτη του Ν. Νικολαΐδη το 1962, όπου και με την βοήθεια του Μ. Εξάρχου,

κατασκευάστηκε ένα δίκτυο στραγγιστικών τάφρων σε μια περιοχή 185.000 στρεμμάτων.

Μετά την αποστράγγιση της λίμνης έγιναν μελέτες με σκοπό την δημιουργία ταμιευτήρων, αλλά και για νέα αντιπλημμυρικά έργα, όπως για παράδειγμα μια μελέτη από τα γραφεία “Α-Ω” και “Νικολαΐδης” για την δημιουργία ταμιευτήρα 42.000 στρεμμάτων στο χαμηλότερο σημείο της πρώην λίμνης. Μια άλλη μελέτη του «Αγροτικού Συνεταιρισμού Κάρλας», πρότεινε την δημιουργία 90 μικρών ταμιευτήρων, ενώ το τότε “Υπουργείο Δημοσίων Έργων” πρότεινε την κατασκευή ενός ταμιευτήρα 15.000-20.000 στρέμματος, που θα συνδεόταν με σύραγμα με το Αιγαίο Πέλαγος. Τέλος η “Υπηρεσία Έγγειων Βελτιώσεων” του Βόλου πρότεινε και κατασκεύασε, εν τέλει, έναν μικρό ταμιευτήρα έκτασης 3.500 στρεμμάτων.

#### 2.1.2. Η λίμνη Κάρλα πριν την αποξήρανση

Η λίμνη Κάρλα, αποτελούσε την νοτιοανατολική απόληξη της πεδιάδας της Λάρισας και την γεωγραφική συνέχεια αυτής. Βρισκόταν νοτιο-ανατολικά της Λάρισας κοντά στις βόρειες πλαγιές του Πηλίου, στα όρια των Νομών Λαρίσης και Μαγνησίας. Το δε κέντρο της ήταν το βαθύτερο τμήμα της θεσσαλικής πεδιάδας (Παπακώστα 2010) και η επιφάνειά της ήταν αυξομειούμενη από 60 έως 180 περίπου τετραγωνικά χιλιόμετρα, Ήταν ο μοναδικός υγρότοπος της κεντροανατολικής Ελλάδας (Ρούσκας 2001), ο οποίος τον τελευταίο χειμώνα της ζωής του φιλοξένησε πάνω από 430.000 υδρόβια πουλιά κρατώντας ως τότε την δεύτερη θέση ως υγρότοπος υψίστης σημασίας για την Νότια Ευρώπη μετά τον Δούναβη (Ρούσκας 2001).

Οι σημαντικότεροι οργανισμοί που αναπτύσσονταν και επιβίωναν στην λίμνη Κάρλα είναι τα ψάρια και τα πουλιά. Ψάρια, όπως τσιρώνια (*Rutilus rutilus*), κέφαλοι (*Lenciscus cephalus*), γωβιοί (*Gobio gobio*), πεταλούδες (*Carassius carassius*) και κυπρίνοι (*Cyprinus carpio*) (Νίκας 2010) ήταν από τα επικρατέστερα είδη, που έδιναν ζωή στους ψαράδες της περιοχής (Ρούσκας 2001). Σύμφωνα με τη Διεύθυνση Αλιείας, η επισήμως φορολογούμενη ποσότητα αλιευμάτων έφθανε τις καλές χρονιές τους 900 τόνους. Περίπου 1.000 οικογένειες ψαράδων ζούσαν από την αλιεία (Χαραλαμπίδου 1999).

Επίσης πολύ σημαντικοί οργανισμοί της λίμνης ήταν και τα πουλιά. Τα μεγάλα υγρολίβαδα, τα πλημμυρισμένα ρηχά τμήματα με αρμυρικά, τα βαθύτερα τμήματα με πλούσια υδρόβια βλάστηση, τα πολλά νησάκια και λιβάδια καθώς και η αφθονία σε τροφή (ψάρια κ.τ.λ.) ήταν η αιτία που η Κάρλα φιλοξενούσε πάνω από 430.000 υδρόβια πουλιά. Κάποια από τα είδη που φώλιαζαν στη λίμνη από την άνοιξη ήταν οι καλαμοκανάδες, οι καπακλήδες, οι χουλιαρόπαπιες και οι θαλασσαετοί (Χριστόπουλος 2013).

Η λίμνη αποξηράνθηκε το 1962, επειδή την εποχή εκείνη προκαλούσε πλημμύρες στις πέριξ γεωργικές καλλιέργειες, ενώ ορισμένες βαλτώδεις εκτάσεις γύρω της προκαλούσαν την έντονη παρουσία εντόμων (Ρούσκας 2001). Οι ειδικοί όμως δεν προέβλεψαν τις επιπτώσεις που θα είχε στο οικοσύστημα η παρέμβαση αυτή στη φύση. Οι τοπικές κλιματολογικές συνθήκες άλλαξαν, ξηρασία και ανομβρία επικρατούσε σε μεγάλο βαθμό στην περιοχή, καθώς επίσης και η υπεράντληση των υπογείων υδάτων, ενώ προκειμένου να ποτιστούν οι μεγάλες εκτάσεις γης που δόθηκαν στους γεωργούς, δημιουργήθηκαν ρήγματα στο έδαφος της περιοχής, και το κυριότερο, η χλωρίδα και πανίδα της περιοχής εξαφανίστηκε και διαταράχθηκε η ισορροπία του οικοσυστήματος (Ρούσκας 2001).

### 2.1.3. Το έργο της επανασύστασης

Οι λίμνες από τη στιγμή της γέννησής τους και μετά, βρίσκονται σε μονόδρομη πορεία προς το φυσικό θάνατό τους, όταν η υδάτινη στήλη της λίμνης πληρωθεί, από χερσογενή υλικά που εισρέουν σ' αυτήν (Scheffer 2004, Wetzel 2006). Αντιθέτως η πλήρωση μιας λίμνης με νερό, μπορεί να παρακολουθηθεί μόνον στις περιπτώσεις τεχνητών υδροματιευτήρων.

Στην Ελλάδα, αυτήν τη στιγμή λαμβάνει χώρα η πλήρωση της αποξηρανθείσας λίμνης Κάρλας, όπως αποφασίστηκε το 1982, παρέχοντας μια μοναδική ευκαιρία σε παγκόσμιο επίπεδο, για την παρακολούθηση της αναγέννησης μιας φυσικής λίμνης (Μαργαρίτη 2011).

Η νέα λίμνη Κάρλα θα έχει συνολική έκταση 38.000 στρεμμάτων. Το έργο περιλαμβάνει μεγάλα αναχώματα (ανατολικά, νότια και δυτικά της λίμνης), μεγάλους συλλεκτήρες οι οποίοι θα μεταφέρουν τα νερά της βροχής αλλά και νερά από τον ποταμό Πηνειό στο εσωτερικό της λίμνης, αντιπλημμυρικά και αρδευτικά έργα, δεντροφυτεύσεις, μουσείο λιμναίου πολιτισμού, κέντρα πληροφόρησης πολιτών, κατασκευή δύο μικρών νήσων εσωτερικά της λίμνης που θα χρησιμεύουν ως καταφύγια πουλιών, δρόμους περιμετρικά της λίμνης, πλακόστρωτα μονοπάτια στην γύρω περιοχή, ποδηλατόδρομους κλπ. (Ρούσκας 2001).

Η επαναδημιουργία της λίμνης Κάρλας θα έχει ως αποτέλεσμα αφ' ενός να επέλθει ξανά η ισορροπία στη φύση και αφ' ετέρου να μετατραπεί η περιοχή σε πόλο έλξης επισκεπτών για παρατήρηση και ψυχαγωγία σύμφωνα πάντα με το δίκτυο Natura 2000.

#### 2.1.4. Το σημείο δειγματοληψίας

Η λίμνη Κάρλα, τοποθετείται  $39^{\circ} 29' 02'' \text{B}$ ,  $22^{\circ} 51' 41'' \text{A}$ , (Παπακώστα Ε. 2010), ενώ η δειγματοληψία έλαβε χώρα στην περιοχή του βυθομετρητή (με συντεταγμένες  $39^{\circ} 48' 41'' \text{B}$ ,  $22^{\circ} 86' 19'' \text{A}$ ), ο οποίος εντοπίζεται περίπου στο μέσο του ανατολικού αναχώματος όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.



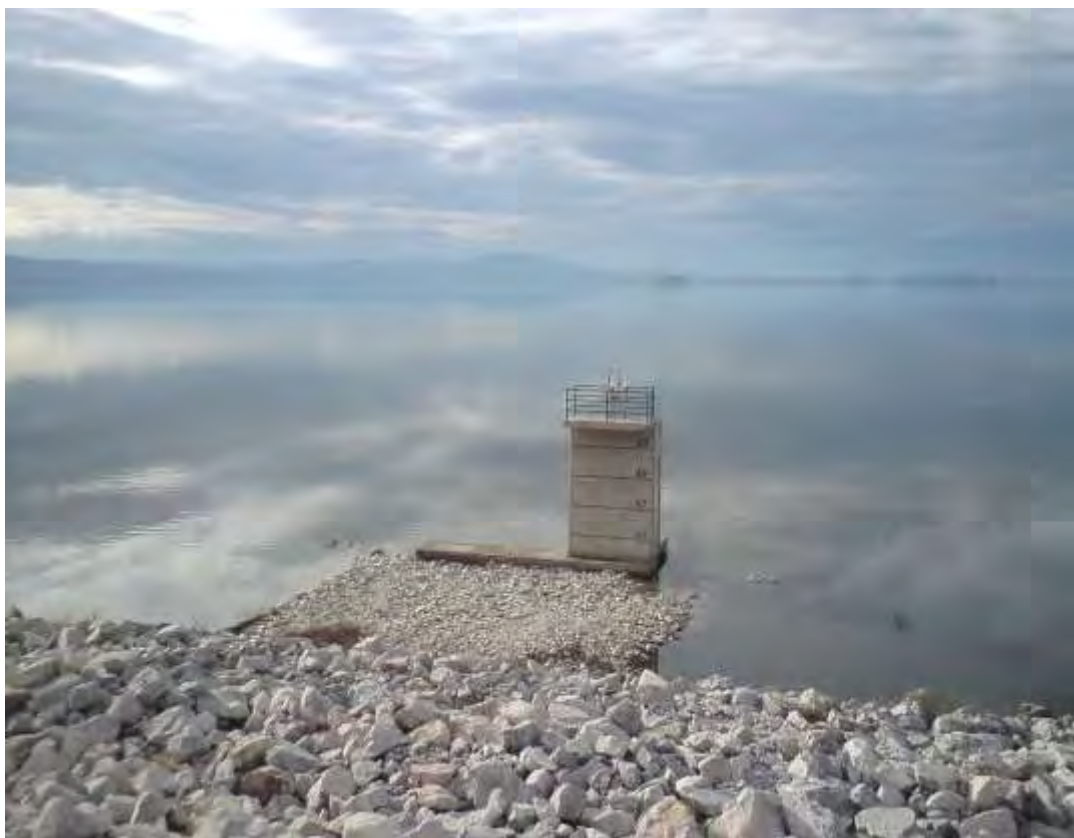
**Εικόνα1: Το σημείο δειγματοληψίας (GOOGLE MAPS)**

#### 2.2. Δειγματοληψία

Το μέγιστο βάθος της λίμνης την περίοδο των δειγματοληψιών (περίπου 2m.), καθώς και οι άνεμοι που πνέουν στην περιοχή και επιδρούν στον κυματισμό και συνεπώς στην ανάδευση της, οδήγησαν στο να χαρακτηριστεί η υδάτινη στήλη

ομοιογενής και να χρειαστεί έτσι μόνο ένα σημείο δειγματοληψίας, αυτό του βυθομετρητή.

Η δειγματοληψία έλαβε χώρα κατά τους μήνες Νοέμβριο, Δεκέμβριο του 2010 και Ιανουάριο του 2011 (25-11-2010, 26-12-2010 και 26-01-2011), και τα δείγματα που συλλέχθηκαν, ονομάστηκαν αντίστοιχα με τους κωδικούς KRL09, KRL10 και KRL11.



**ΕΙΚΟΝΑ2: Ο βυθομετρητής, 12<sup>ος</sup> 2010**

Η διαδικασία της δειγματοληψίας ακολούθησε τα εξής στάδια: τα αποστειρωμένα πλαστικά (πολυαιθυλενικά) δοχεία (χωρητικότητας 500 ml έκαστο) ξεπλύθηκαν τρεις φορές με νερό από τη λίμνη, ενώ το νερό έκπλυσης απορρίφθηκε σε σημείο που δεν επηρέαζε την δειγματοληψία. Εν συνεχεία

τοποθετήθηκαν πάλι στην υδάτινη στήλη σε βάθος περίπου 30 cm. και με ανοδική κίνηση έγινε η συλλογή του ύδατος.

Επίσης συλλέχθηκαν μετρήσεις πεδίου και για αβιοτικούς παράγοντες τις ίδιες ημερομηνίες. Συγκεκριμένα μετρήθηκαν η αγωγιμότητα, η θερμοκρασία και το pH, με την χρήση αντίστοιχων οργάνων, αφού ελέχθησαν και ρυθμίστηκαν όπου χρειάστηκε.

### 2.3.Επεξεργασία δειγμάτων

#### 2.3.1. Παρασκευή δειγμάτων για ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (S.E.M.)

Στο εργαστήριο έγινε πλήρωση των δοχείων της δειγματοληψίας με μονιμοποιητικό υγρό (γλουταραλδεΰδη) σε τελικό ποσοστό 2,5% και εν συνεχεία τοποθετήθηκαν σε θερμοκρασία 4°C (ψυγείο), όπου η γλουταραλδεΰδη έχει την μέγιστη μονιμοποιητική δράση της.

Ο λόγος που χρησιμοποιήθηκε γλουταραλδεΰδη σε τελικό ποσοστό 2,5% προέκυψε από εμπειρική παρατήρηση. Το πρώτο δείγμα (KRL09) χωρίστηκε σε τρία επιμέρους δείγματα, τα οποία πληρώθηκαν με διαφορετικές ποσότητες γλουταραλδεΰδης (1%, 2,5% και 3,5% οι τελικές συγκεντρώσεις), και αργότερα μέσω της παρατήρησής τους στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σαρώσεως απορρίφθηκε το πρώτο (1%), λόγω μικρής αποτελεσματικότητας του μονιμοποιητικού μέσου, ενώ στα άλλα δύο (2,5% και 3,5%) δεν παρατηρήθηκε διαφορά, με αποτέλεσμα να επιλεγεί το μικρότερο ποσοστό για λόγους οικονομίας και μείωσης της τοξικότητας του δείγματος λόγω χαμηλότερης συγκέντρωσης γλουταραλδεΰδης.

Τα δείγματα μετά την μονιμοποίηση τους και την παραμονή τους στο ψυγείο (4°C) για τουλάχιστον δύο ώρες (μέγιστος χρόνος παραμονής 12 ώρες), διηθήθηκαν υπό κενό (<100mm στήλης Hg), με την χρήση ενός χωνιού Buchner και μίας αντλίας κενού. Από κάθε δείγμα διηθήθηκαν 10 ml. Οι ηθμοί που χρησιμοποιήθηκαν ήταν κατασκευασμένοι από μεμβράνη PTFE ίσου πόρου (διάμετρος πόρου 0,2 μm.), και ο λόγος που χρησιμοποιήθηκαν ήταν προκειμένου να κρατηθούν πάνω στον ηθμό όλοι οι ευκαριωτικοί οργανισμοί που υπήρχαν στο δείγμα.

Μετά την διήθηση, οι ηθμοί τοποθετήθηκαν προσεκτικά (με την επιφάνεια που περιείχε τους ευκαρυώτες, προς τα πάνω) σε διηθητικό χαρτί ώστε να απορροφηθεί η περίσσεια ύδατος από τους ηθμούς. Οι ηθμοί σκεπάστηκαν με πλαστικά τρυβλία ώστε να εμποδιστεί η επικάθιση σκόνης και αφέθηκαν προς ξήρανση σε θερμοκρασία δωματίου (22°C) για μία νύχτα. Δεν πραγματοποιήθηκε αφυδάτωση με χρήση αλκοολών, καθώς σε παλαιότερες μελέτες παρατηρήθηκε ότι δεν υπάρχει διαφορά ανάμεσα σε αφυδατωμένα και μη δείγματα.

Εν συνεχεία από τα δείγματα (ηθμοί) επιλέχθηκαν και κόπηκαν μικρά τμήματα, τα οποία με την χρήση ειδικής, αγωγίμης και διπλής όψεως ταινίας επικολλήθηκαν πάνω στους ειδικούς υποδοχείς του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σαρώσεως (stubs), και τοποθετήθηκαν στη συσκευή επιμετάλλωσης τύπου BALTEC (εικ.3).





**Εικόνα3: Ο επιμεταλλωτής scd005**

Κατά την διαδικασία της επιμετάλλωσης τα δείγματα βρίσκονταν σε έναν αεροστεγώς κλεισμένο θάλαμο, αποκλειστικά με παρουσία αργού (Ar), όπου στην άνω επιφάνειά του βρισκόταν ένα λεπτό φύλλο (στόχος) χρυσού (Au). Το μηχάνημα ρυθμίστηκε στα 40 mA. για 120 sec. Κατά την εφαρμογή τάσης στον θάλαμο επήλθε ιονισμός του αργού με αποτέλεσμα ιόντα χρυσού που αποκολλούνταν από το φύλλο χρυσού να επικάθονταν πάνω στο δείγμα. Μετά το πέρας 120 δευτ. Είχε πλέον δημιουργηθεί πάνω στο δείγμα ένα λεπτό στρώμα χρυσού με επαρκή αγωγιμότητα.

### 2.3.2. Παρατήρηση δειγμάτων σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (S.E.M.)

Μετά και την επιμετάλλωση τα δείγματα τοποθετήθηκαν στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σαρώσεως (S.E.M), προς παρατήρηση και φωτογράφιση.

Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σαρώσεως που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία ήταν το Stereoscan 240 της εταιρείας Cambridge (εικ4).

Τα δείγματα εξετάστηκαν υπό κενό ( $10^{-5}$  -  $10^{-6}$  torr). Οι φωτογραφίες τραβήχτηκαν με αναλογική φωτογραφική μηχανή κατάλληλα προσαρμοσμένη στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Η τάση λειτουργίας του μικροσκοπίου ήταν 12 KV.



**Εικόνα4:** Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (S.E.M.).

#### 2.4.Επεξεργασία φωτογραφιών

Οι εικόνες που προέκυψαν κατά την παρατήρηση των δειγμάτων στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σαρώσεως, όπως αναφέρθηκε, αποτυπώθηκαν πάνω σε έγχρωμο φιλμ 100 ASA της εταιρείας Fugifilm.

Τα φιλμ ,αφού εμφανίστηκαν, ψηφιοποιήθηκαν με την χρήση σαρωτή Hp scanjet 5530, εξοπλισμένου με σαρωτή αρνητικών (tma adaptor). Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε κατά την σάρωση του φιλμ ήταν το Hp solution center, το οποίο ρυθμίστηκε στα 1600 dpi με 400% μεγέθυνση και σε 8-bit gray scale, (256 αποχρώσεις του γκρι χρώματος).

Μετά την ψηφιοποίηση των φωτογραφιών ακολούθησε η επεξεργασία τους, η οποία και έγινε με το πρόγραμμα G.I.M.P.. Αρχικά έγινε περικοπή του φωτογραφημένου μικροοργανισμού, αποκοπή και επικόλληση του σε νέο αρχείο (layer) με μαύρο φόντο αλλά ίδια ανάλυση. Τέλος έγινε μια τελική επεξεργασία με το πρόγραμμα focus magik, για μεγαλύτερη αντίθεση και καλύτερη ποιότητα εστίασης στις φωτογραφίες.

Από τις φωτογραφίες που τελικώς προέκυψαν, έγινε η αναγνώριση των ευκαρυωτικών μικροοργανισμών που παρουσιάζονται στην παρούσα εργασία.

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

#### 3.1. Αβιοτικοί παράγοντες

Ο πίνακας που ακολουθεί παρακάτω, περιλαμβάνει τις αβιοτικές παραμέτρους που μετρήθηκαν κατά τη διάρκεια των δειγματοληψιών:

**Πίνακας1:** Αβιοτικές παράμετροι στην Κάρλα, Νοεμβρης, Δεκεμβρης και Ιανουάριος 2010-2011

Δείγμα	Ημερομηνία	pH	Θερμοκρασία	Αλατότητα	Αγωγιμότητα
		-	°C	PSU	μS/cm
<b>KRL 09</b>	25-11-10	8.8	12.2	2.9	5.51
<b>KRL 10</b>	26-12-10	8.6	8.6	2.7	5.14
<b>KRL 11</b>	26-01-11	9.2	5.2	2.1	4.09

Η θερμοκρασία του ύδατος παρουσιάζει μια πτωτική τάση λόγω του μικρού βάθους της λίμνης η θερμοκρασία επηρεαζόταν άμεσα από εξωτερικές παραμέτρους, όπως η θερμοκρασία περιβάλλοντος, η οποία με τη σειρά της επηρέαζε και τις υπόλοιπες παραμέτρους, όπως το διαλυμένο οξυγόνο ή την αύξηση των μικροοργανισμών.

Το pH της λίμνης, είναι εξίσου σημαντικό γιατί υποδεικνύει ποια είδη μικροοργανισμών μπορούν να επιβιώσουν και να αναπτυχθούν στο βασικό pH της. Ύδωρ με pH μικρότερο του 5 και μεγαλύτερο του 9,5 δε θεωρείται ικανό να διατηρήσει ζωή (Ahluwalia 2003).

Οι μετρήσεις της αλατότητας, κατά τους τρεις μήνες της δειγματοληψίας, επιβεβαίωσαν το γεγονός, ότι η αλατότητα της λίμνης συνεχώς μειώνεται. Προηγούμενες μετρήσεις (Oikonomou et. al. 2012) έδειξαν κύμανση της αλατότητας από 13,2 έως 7,6. Ένα χρόνο μετά κυμαίνεται ανάμεσα στο 2,9

και 2,1 (περίπου το 1/10 της ανοιχτής θάλασσας), λόγω των συνεχών εισροών γλυκού νερού που χρησιμοποιούνται για την πλήρωση της λίμνης. Η αλατότητα μπορεί επίσης να «υποδείξει» τους μικροοργανισμούς που αναμένονται να απαντηθούν στην υδάτινη στήλη.

Τέλος η αγωγιμότητα, άμεσα εξαρτώμενη από τη θερμοκρασία, υποδεικνύει το πλήθος και τις διακυμάνσεις των διαλυμένων στερεών, κυρίως ανόργανων αλάτων, στην υδάτινη στήλη.

### 3.2.Ευκαρυωτικοί οργανισμοί

Με τον ελληνικό, διεθνή σήμερα όρο, ευκαρυωτικά κύτταρα, ευκαρυώτες ή ευκάρυα, ονομάζονται τα κύτταρα ή οι μονοκύτταροι μικροοργανισμοί, κυρίως μύκητες, πρωτόζωα και μικροφύκη, τα οποία έχουν πλήρως σχηματισμένο πυρήνα, ο οποίος περιβάλεται από την πυρηνική μεμβράνη και ξεχωρίζει από το κυτταρόπλασμα. Η ονομασία του προέρχεται από την αρχαία ελληνική λέξη "κάρυον" (Sina et al. 2005), και αντιδιαστέλλονται με κύτταρα που δεν έχουν σχηματισμένο πυρήνα, τα λεγόμενα προκαρυωτικά κύτταρα, αλλά και τους ιούς.

Από αυτό το είδος κυττάρων αποτελούνται ορισμένοι μονοκύτταροι οργανισμοί, όπως τα πρωτόζωα, οι μύκητες και τα φύκη, αλλά και όλοι οι πολυκύτταροι οργανισμοί (μετάζωα), όπως τα φυτά και τα ζώα. Εξετάζοντας τη δομή αυτών των κυττάρων, παρατηρείται ότι εξωτερικά περικλείονται από τη λεγόμενη πλασματική μεμβράνη ενώ εσωτερικά ο πυρήνας διαχωρίζεται από το υπόλοιπο κύτταρο πάλι με την πυρηνική μεμβράνη. Ανάμεσα στον πυρήνα και στην πλασματική μεμβράνη, υπάρχουν διάφορα οργανίδια, όπως μιτοχόνδρια, λυσόσωμα, ριβόσωμα κ.α., τα οποία είναι υπεύθυνα για τις διάφορες λειτουργίες

του κυττάρου. Τα ευκαρυωτικά κύτταρα εμφανίστηκαν στην εξέλιξη της ζωής πολύ αργότερα από τα προκαρυωτικά, τα οποία είναι απλούστερα στην δομή και δεν έχουν πυρήνα (Burki et al 2007).

Στις παρακάτω εικόνες παρουσιάζονται τα ευρήματα των ευκαρυωτικών μικροοργανισμών που βρέθηκαν στην λίμνη Κάρλα, χωρισμένα αρχικώς σε πρότιστα, μύκητες και φύκη, και στη συνέχεια σε συνομοταξίες.

### 3.2.1. Πρωτογενείς παραγωγοί

Τα φύκη, είναι υδρόβιοι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί οι οποίοι δεν έχουν βλαστούς, μίσχους, φύλλα, ρίζες και δεν σχηματίζουν σπέρματα, άνθη ή καρπούς, όπως τα ανώτερα φυτά (E.P.A.1992 και Ahluwalia 2003). Αντίθετα, έχουν πρωτόγονες μεθόδους αναπαραγωγής, πρωτόγονη οργάνωση, πολύ απλή στις κατώτερες ταξινομικές ομάδες και πιο πολύπλοκη στις ανώτερες. Σχηματίζουν σπόρια αντί σπέρματα και πολλά από αυτά παρουσιάζουν πολύπλοκους βιολογικούς κύκλους. Διαφέρουν πολύ από τα Σπερματοφύτα, τόσο από τα χερσαία όσο και από τα θαλάσσια, τα οποία πολλές φορές λόγω σύγχυσης, αποκαλούνται «φύκια» (ΕΛ.Φ.Ε. 2008).

Τα φύκη, μπορούν να είναι είτε μονοκύτταρα είτε πολυκύτταρα, και συναντώνται ιδιαίτερα σε υδάτινο περιβάλλον (γλύκα και αλμυρά νερά). Το μέγεθός τους κυμαίνεται από μερικά μm σε διάμετρο (μικροσκοπικά μονοκύτταρα μικροφύκη, όπως το *Ostreococcus*), έως και 60 μέτρα τα γιγάντια φύκη (giant kelps).

Υπάρχουν επίσης αερόβια φύκη τα οποία φωτοσυνθέτουν και αναπτύσσονται με απλά ανόργανα συστατικά ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{NO}_3^-$  και  $\text{PO}_4^-$ ) χρησιμοποιώντας το φως ως πηγή ενέργειας μέσω των χλωροπλαστών. Παράγουν

οξυγόνο κατά την διάρκεια της ημέρας και το καταναλώνουν κατά την διάρκεια της νύχτας, συμβάλλοντας έτσι στον κύκλο του άνθρακα (Κοντογιαννάτου 2012).

Τα φύκη που αναγνωρίστηκαν στην λίμνη Κάρλα ανήκουν στα χλωρόφυτα (chlorophyta), τα οποία ήταν το επικρατέστερο φύλο τους μήνες Μάρτιο και Απρίλιο 2010 (Οικονομου et al. 2012), και βρέθηκαν τους μήνες Νοέμβριο και Δεκέμβριο του 2010:

#### A. Γένος *Coelastrum*:

Η παρουσία μιας αποικίας ή ενός και μόνο είδους του γένους *Coelastrum* σε κάποια λίμνη ή θαλάσσιο οικοσύστημα είναι δείκτης παρουσίας γλυκού νερού, κάτι που επιβεβαιώνεται από τις μετρήσεις θερμοκρασίας και του pH, στους αβιοτικούς παράγοντες που αναφέρθηκαν. Μπορεί να απαντηθεί σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών, από πολικά έως υποτροπικά κλίματα, ενώ συχνότερα απαντάται σε εύτροφα οικοσυστήματα (Patterson 1996). Στην λίμνη Κάρλα βρέθηκε τον μήνα Δεκέμβρη (KRL10).

#### B. Γένος *Tetrastrum*:

Στην εικ.5 παρατηρείται η πιο κοινή μορφή του γένους *Tetrastrum*, με 4 κύτταρα, το οποίο παρατηρήθηκε επίσης τον Δεκέμβρη (KRL10). Μια σπανιότερη μορφή του που περιλαμβάνει 16 κύτταρα, επίσης βρέθηκε στην λίμνη Κάρλα και παρουσιάζεται παρακάτω. Ομοίως με το *Coelastrum*, συναντάται συχνά σε εύτροφα οικοσυστήματα, δημιουργεί αποικίες και έχει μεγάλη γεωγραφική εξάπλωση (Chodat 1895).

### C. Γένος *Scenedesmus*:

Το γένος *Scenedesmus*, ως φυτοπλαγκτό, δημιουργεί και αυτό αποικίες, επίσης απαντάται ως επί το πλείστον σε οικοσυστήματα με μεγάλη συγκέντρωση αμμωνίας και φωσφόρου (Gonzales et al. 1997). Κάποια από τα είδη του παράγουν τοξίνες για την προστασία τους από το ζωοπλαγκτό που το θηρεύει, όπως η *Daphnia magna*, και θεωρούνται τοξικά (Hessen 1993). Στη λίμνη Κάρλα βρέθηκε τους μήνες Νοέμβρη και Δεκέμβρη (KRL09- KRL10).

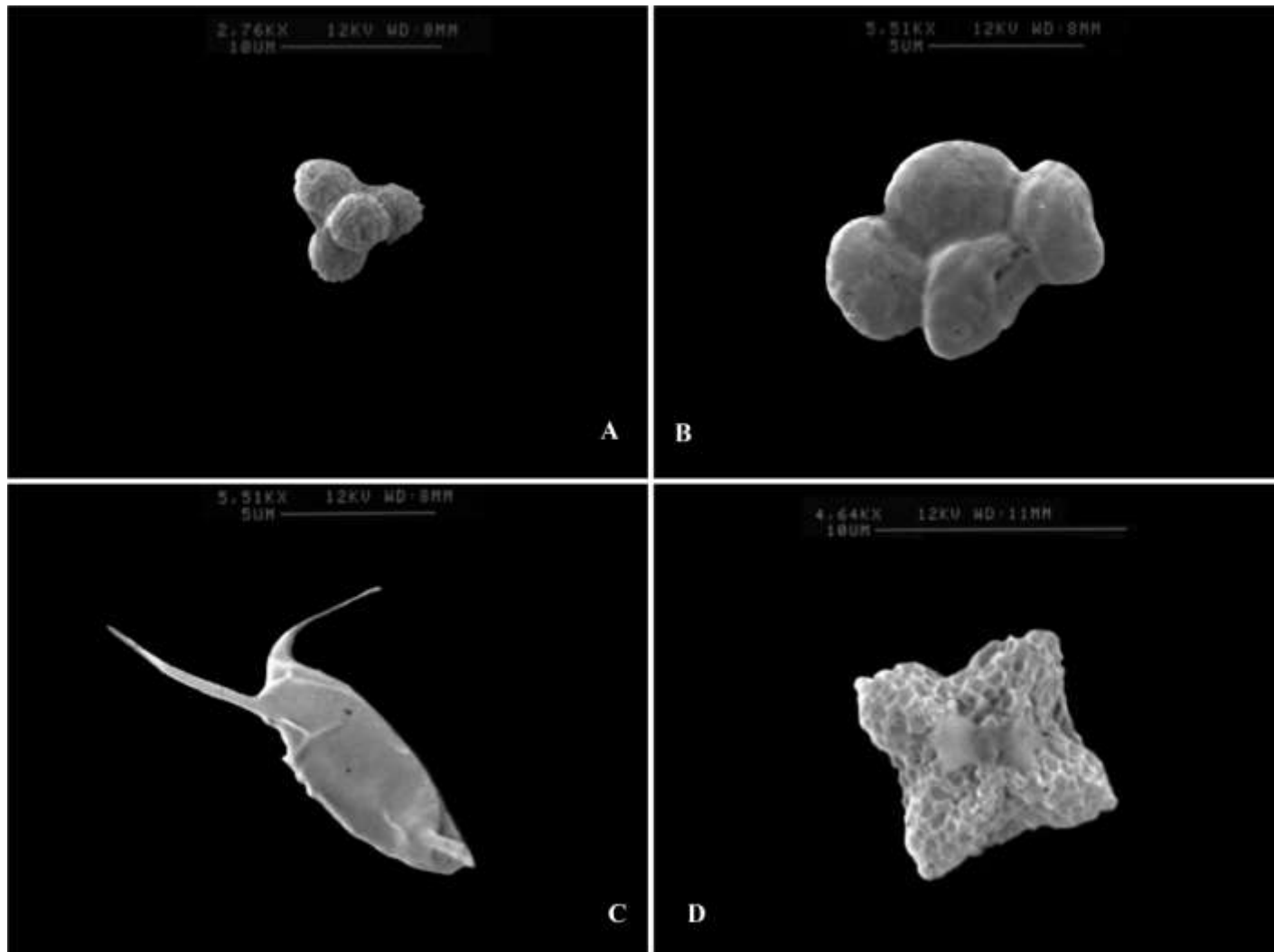
### D. Γένος *Tetraedoron*:

Το *incertae sedis* γένος *Tetraedoron* ανήκει στα chlorophyta και μέχρι σήμερα έχει αναφερθεί μόλις ένα είδος (*Tetraedoron bitridens*). Η συστηματική του κατάταξη παραμένει ακόμη και σήμερα αβέβαιη καθώς δεν υπάρχουν διαθέσιμα στοιχεία σχετικά με την μοριακή ταξινόμησή του βάσει φυλογενετικών γονιδίων, όπως το 18S rRNA.

### F. *Scenedesmus acuminatus*:

Σε σχέση με τα άλλα είδη του γένους *Scenedesmus*, το *S. Acuminatus*, θεωρείται πολύ πιο τοξικό, καθώς παράγει ετερο-πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες (azaarenes metabolites), οι οποίοι είναι ικανοί να προκαλέσουν μέχρι καρκινογενέσεις και τερατογενέσεις, τουλάχιστον στους πληθυσμούς των ιχθυών (Van Vlaardingen 1996). Βρέθηκε τον μήνα Δεκέμβρη (KRL10) στην λίμνη Κάρλα.





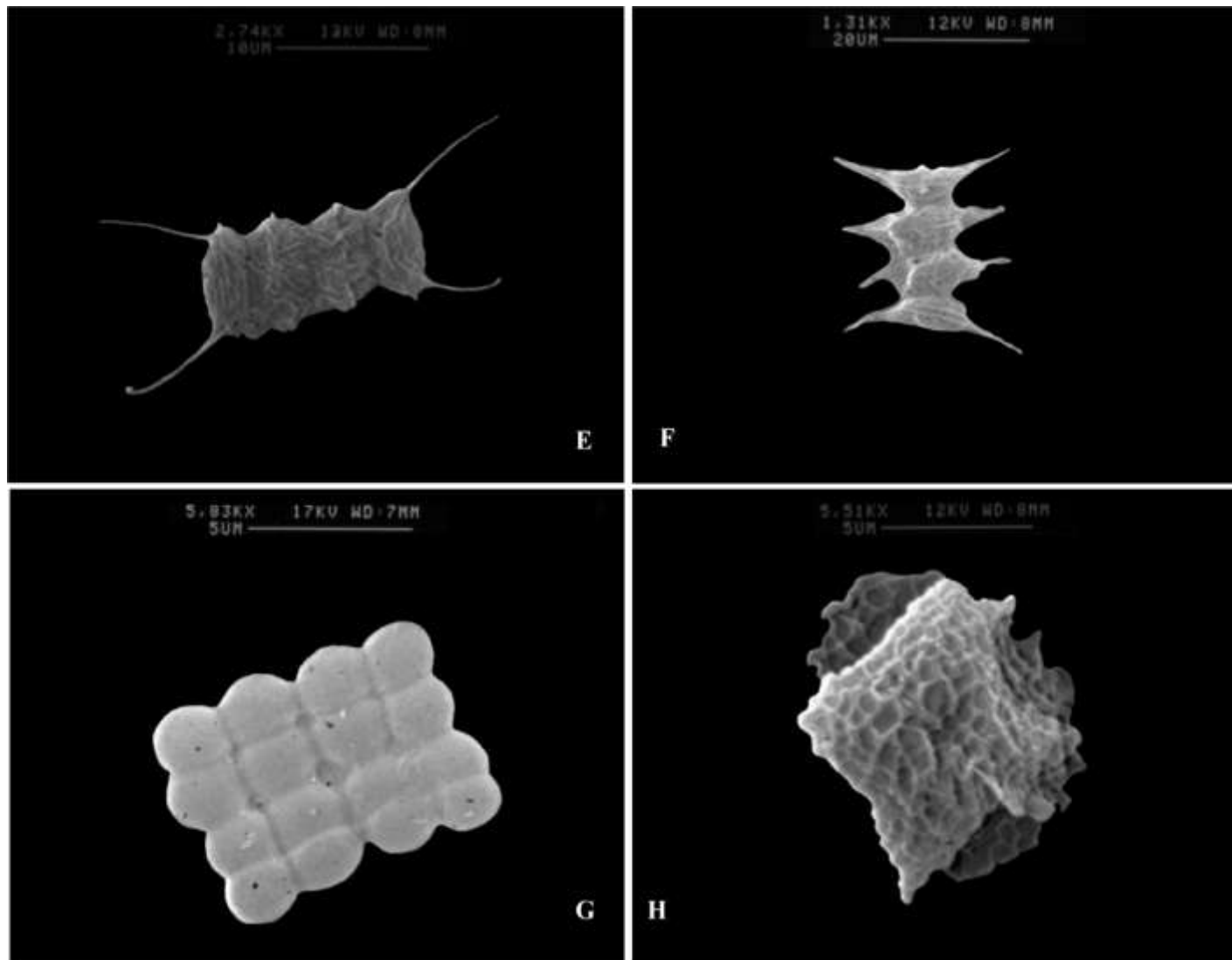
**Εικόνα5:**

(A): *Coelastrum*,

(B): *Tetrastrum*,

(C): *Scenedesmus*,

(D): *Tetraedoron*.



**Εικόνα6:**

**(E):** *Scenedesmus*,

**(F):** *Scenedesmus acuminatus*,

**(G):** *Tetrastrum*,

**(F):** *Tetraedoron*

### 3.2.2. Protista (πρωτόζωα)

Τα πρωτόζωα είναι μονοκύτταροι ευκαρυωτικοί οργανισμοί χωρίς κυτταρικό τοίχωμα. Γενικά, είναι άχρωα με ικανότητα αυτόνομης κίνησης. Απαντούν σε διάφορα ενδιαιτήματα του γλυκού και του θαλασσινού νερού, καθώς και στο έδαφος ή σε εναέρια ενδιαιτήματα (Madigan 2005).

Αν και δεν υπάρχει απόλυτα ακριβής ορισμός για τον όρο, τα πρωτόζωα συχνά αναφέρονται ως μονοκύτταρα ετερότροφα πρότιστα, όπως η αμοιβάδα και τα βλεφαριδοφόρα. Ο όρος πρωτόφυτα, αντίστοιχα, χρησιμοποιείται για να ορίσει πρότιστα που έχουν την ικανότητα της φωτοσύνθεσης. Ωστόσο, ο διαχωρισμός ανάμεσα στα πρωτόζωα και τα πρωτόφυτα είναι συχνά αμφίβολος (Cavanilhac 2000).

Το μέγεθός τους παρουσιάζει μεγάλο εύρος και κυμαίνεται από λίγα μικρόμετρα έως 3 χιλιοστόμετρα. Ζουν σε υδάτινα περιβάλλοντα και εδάφη, ακόμη και ως ξενιστές (παράσιτα) άλλων ζώων, ή και ανθρώπων. Μερικά από τα τελευταία είναι παθογόνα και προκαλούν ασθένειες όπως π.χ. η ελονοσία και η δυσεντερία (Kotpal 2009).

Ως μέλη της μικροπανίδας και της μειοπανίδας, τα πρωτόζωα είναι μια σημαντική πηγή τροφής για αντίστοιχους μικροθηρευτές. Ως θηρευτές, βασίζονται σε μονοκύτταρα ή νηματοειδή φύκη, βακτήρια και μικρομύκητες. Έτσι, ο οικολογικός ρόλος των πρωτοζώων είναι σημαντικός στο να μεταφέρουν την παραγωγή τροφής από τα βακτήρια και τα φύκη στα επόμενα επίπεδα της τροφικής αλυσίδας (Kotpal 2009). Τα πρωτόζωα είναι ταυτόχρονα και φυτοφάγα αλλά και καταναλωτές των αποσυνθετών της τροφικής αλυσίδας. Επίσης ελέγχουν τους πληθυσμούς των βακτηρίων και της βιομάζας σε κάποια έκταση (Cavanilhac 2000).

### 3.2.2.1. Συνομοταξία *Dinophyceae*

Τα δινομαστιγωτά είναι η κυριότερη ομάδα των Πρώτιστα. Μονοκύτταροι μικροοργανισμοί οι οποίοι συναντώνται τόσο σε αλμυρά όσο και σε γλυκά νερά, και η ανάπτυξή τους εξαρτάται κυρίως από την θερμοκρασία και την αλατότητα (Stoecker 1999). Από το σύνολο των δινομαστιγωτών, μόνο ένα 10% επιβιώνει στο γλυκό νερό, ενώ μπορούν να επιβιώσουν μόνο τους ή συμβιωτικά (Encyclopedia.com 2003). Στην λίμνη Κάρλα βρέθηκαν τον μήνα Νοέμβρη και Δεκέμβρη (KRL09-KRL10). Ένα μεγάλο μέρος της συνομοταξίας αυτής είναι τοξικά, παράγοντας νευροτοξίνες, όπως η σαξιτοξίνη, η οποία έχει ισχυρή παραλυτική δράση. Εμφανίζονται ως υπεύθυνα για πολλά φαινόμενα μαζικών θανάτων ιχθύων (Stoecker 1999).

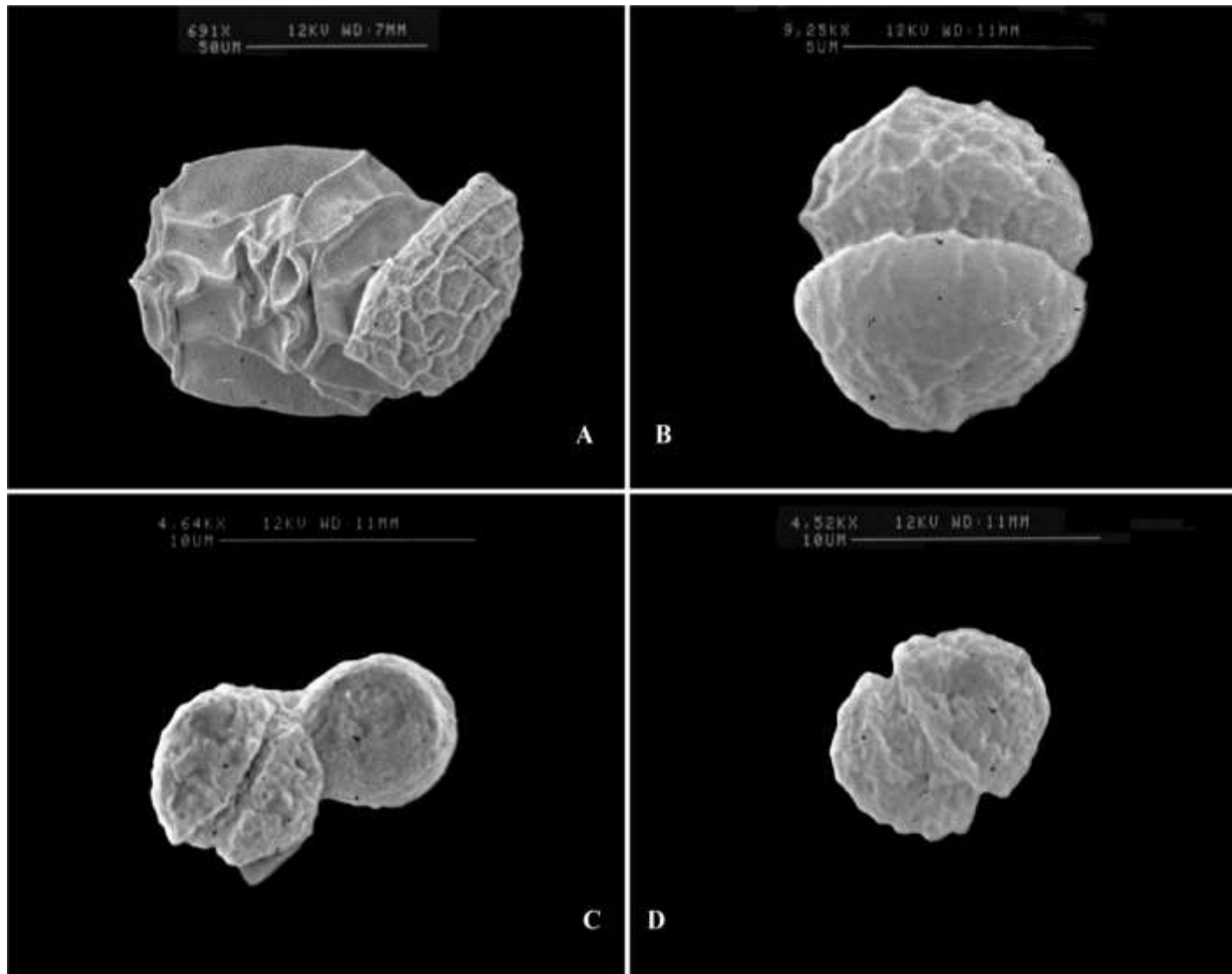
#### A. Φύλο *Alveolata*

Τα περισσότερα *Alveolata* κατατάσσονται στα φύκη και είναι κοινά στο γλυκό νερό. Μπορεί να είναι φωτοσυνθετικοί μικροοργανισμοί, αλλά ως επί το πλείστον είναι μιξότροφοι (Stoecker 1999). Επίσης κάποια είδη μπορεί να είναι ενδοσυμβιωτικά, και άλλα παρασιτικά, διμιουργώντας προβλήματα στους πληθυσμούς των ιχθύων. Τέλος, σε μεγάλες συγκεντρώσεις (water blooms), το νερό που τα περιέχει, βάφεται με κόκκινο χρώμα, φαινόμενο γνωστό και ως «ερυθρά παλίρροια (red tide)». Το φαινόμενο αυτό είναι δυνητικά τοξικό, λόγω των δινοτοξινών (νευροτοξινών) που παράγονται μαζικά (Hoppenrath & Saldarriaga 2012).

## B. Γένος *Pfiesteria*

Το *Pfiesteria* είναι ένα πολύπλοκο δινομαστιγωτό, καθώς έχει πολλές και διαφορετικές φάσεις στον κύκλο του (με ψευδοπόδια, μικροκύστης κ.α.). Από αυτότροφο που είναι, υπό προϋποθέσεις μπορεί να γίνει μιζότροφο, ενώ το είδος *P. piscicida*, είναι πολύ τοξικό και ευθύνεται για πολλούς μαζικούς θανάτων ιχθύων στη Β. Καρολίνα των Η.Π.Α. (Steidinger et al. 1996).

Το *Pfiesteria* μπορεί να θεωρηθεί και θηρευτής, καθώς η τοξίνη που παράγει σκοτώνει τους ιχθύες μαζικά και μετά αναπτύσσεται πάνω στους ιστούς του καταναλώνοντας την σάρκα τους.



**Εικόνα7:**

**(A-B):** *alveolata*,

**(C-D):** *Pfiesteria*.

### 3.2.2.2. Συνομοταξία Euglenozoa

Είναι μια ομάδα αποτελούμενη από αποκλειστικά μονοκύτταρους ευκαρυωτικούς μικροοργανισμούς, της οποίας τα μέλη απεικονίζουν το μεγάλο πρόβλημα που παρουσιάζει η προσπάθεια κατάταξης των πρότιστων ως φυτά ή ως ζώα. Εκτός από ευγληνόζωα, συναντώνται και ως ευγληνωφύκη καθώς από τα 36 γένη, τα 25 δεν έχουν χλωροπλάστες (Φρυδάς 2000).

Εμφανίζουν παγκόσμια κατανομή και απαντώνται σε υδάτινα οικοσυστήματα και έχουν την ικανότητα να φωτοσυνθέτουν. Απαντώνται κυρίως σε εσωτερικά ύδατα (όπως λίμνες, ποτάμια, ρυάκια, λιμνάζοντα νερά) και ειδικά σε πλούσια σε διαλυμένο οργανικό υλικό (ευτροφικό περιβάλλον) (Αρώνη 2008). Ωστόσο, δευτερευόντως κατανέμονται και στη θάλασσα και σε υφάλμυρα νερά. Τα υφάλμυρα είδη Ευγλήνη (*Euglena*) συχνά χρωματίζουν πράσινα τα νερά εκβολών ποταμών και βάλτων, όταν η ένταση του φωτός είναι χαμηλή (Reynolds & Walsby 1997).

#### A. Γένος *Trachelomonas*

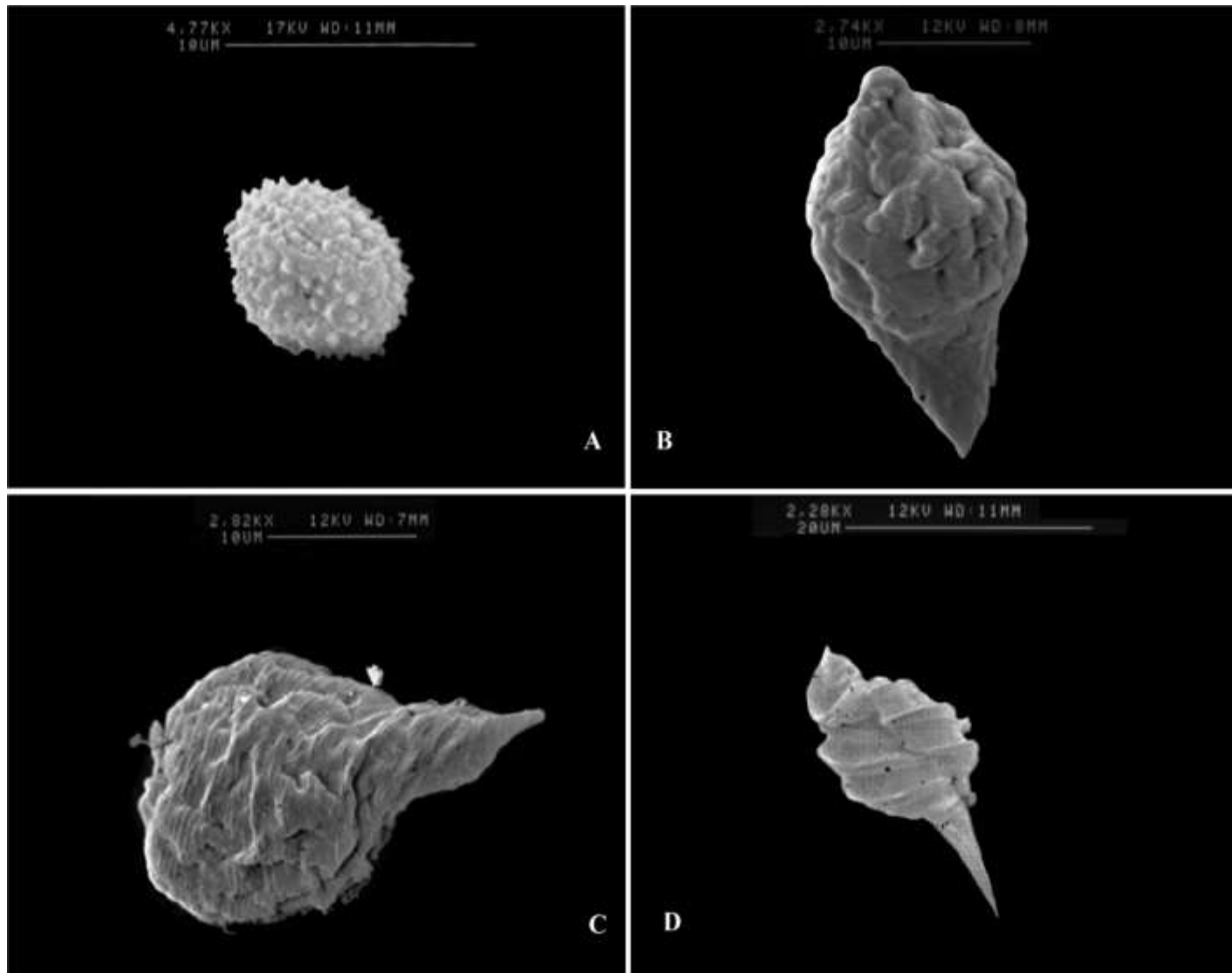
Το χαρακτηριστικό του γένους *Trachelomonas* είναι ένα είδος κελύφου (lorica), το οποίο είναι και διαφορετικό για κάθε είδος του γένους (Brosnan et al. 2005).

Τα περισσότερα είδη είναι φωτότροφα, με διαφορετικά είδη χλωροπλαστών. Έχει παγκόσμια γεωγραφική εξάπλωση σε γλυκό νερό, πλούσιο σε σίδηρο και μαγνήσιο και το σημαντικότερο, συναντάται σε όξινο προς ουδέτερο PH (4,5-7) (Ciugulea et al. 2008), γεγονός που έρχεται σε αντίθεση με την μέτρηση 8.8 που έγινε στο PH την περίοδο της δειγματοληψίας (Δεκέμβριος 2010) στη λίμνη Κάρλα και εντοπίστηκε στην υδάτινη στήλη.

## B. Γένος *Euglena*

Οι ευγλήνες είναι τα πλέον γνωστά είδη στην υδάτινη στήλη. Παρουσιάζουν παγκόσμια γεωγραφική κατανομή σε εσωτερικά κυρίως ύδατα, με γλυκά και υφάλμυρα νερά (Lee 2008). Πρόκειται για αυτότροφους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς που ζουν ελεύθεροι. Συνήθως έχουν ένα ή δύο μαστίγια, ενώ εμφανίζονται συχνά σε εύτροφα περιβάλλοντα. Στην λίμνη Κάρλα βρέθηκαν τον Νοέμβρη και τον Δεκέμβρη του 2010 (KRL09-KRL10).





**Εικόνα8:**

**(A):** *Trachelomonas*,

**(B-C-D):** *Euglena*.

### 3.2.2.3. Συνομοταξία Heterokontophyta

Η ομάδα των Heterokontophyta περιλαμβάνει ένα μεγάλο εύρος του βασιλείου των Protista, καθώς στη συνομοταξία αυτή ανήκουν γένη και είδη που είναι διάτομα ή και φύκη (brown algae) (Andersen 2004). Διαθέτουν χλωροπλάστες, όπως πολλά γένη, αλλά ξεχωρίζουν από τα υπόλοιπα ευκάρυα, λόγω της ύπαρξης τεσσάρων μεμβρανών γύρω από τους χλωροπλάστες (Riisberg et al. 2009). Τέλος συναντώνται σε αρκτικές θερμοκρασίες και σε γλυκά νερά (Ashrafi 1999).

#### A. Γένος *Nitzschia*

Το γένος αυτό συνηθίζεται σε χαμηλές θερμοκρασίες, και συναντάται κυρίως σε αρκτικά κλίματα, ενώ τα περισσότερα είδη προτιμούν και την υψηλή αλατότητα (Aletsee et al. 1992), κάτι το οποίο έρχεται σε αντιδιαστολή με τις μετρήσεις αλατότητας, αλλά και θερμοκρασίας που έγιναν κατά την περίοδο της δειγματοληψίας (Νοέμβριος 2010 και Ιανουάριος 2011, πιθανολογείται ότι υπήρχε και τον μήνα Δεκέμβρη).

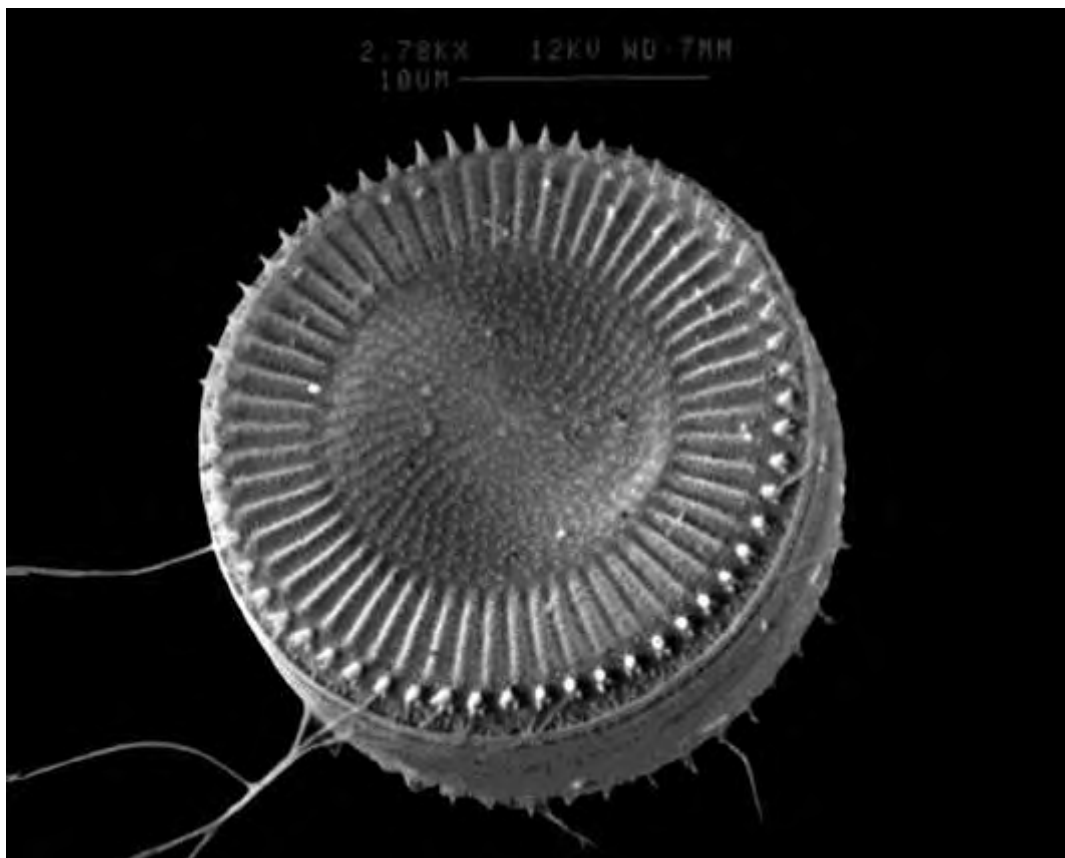
Πολλά είδη του γένους *Nitzschia* θεωρούνται πολύ τοξικά, ακόμα και για τον άνθρωπο, καθώς παράγουν μια συγκεκριμένη νευροτοξίνη, το δομοϊκό οξύ, το οποίο συσσωρεύεται στα οστρακοειδή. Με την κατανάλωσή τους ο άνθρωπος παρουσιάζει συμπτώματα αμνησίας (amnesic shellfish poisoning) (Clark et al. 1999).

## B. Γένος *Cyclotella*

Συναντάται συνήθως σε γλυκά νερά με χαμηλές θερμοκρασίες, ενώ μόλις δύο είδη του γένους συναντώνται σε παράκτια ρηχά νερά (Tomas 1996), και συνήθως όπου εμφανίζεται είναι και το κυρίαρχο γένος (Wunsam et al. 1995), όπως παρατηρήθηκε και στην λίμνη Κάρλα (Νοέμβριος 2010 - KRL09). Συνήθως προτιμά λίμνες με μεγάλη συγκέντρωση φωσφόρου, ενώ μπορεί να αναπτυχθεί και σε περιβάλλον με ελάχιστα θρεπτικά (Wunsam et al. 1995).



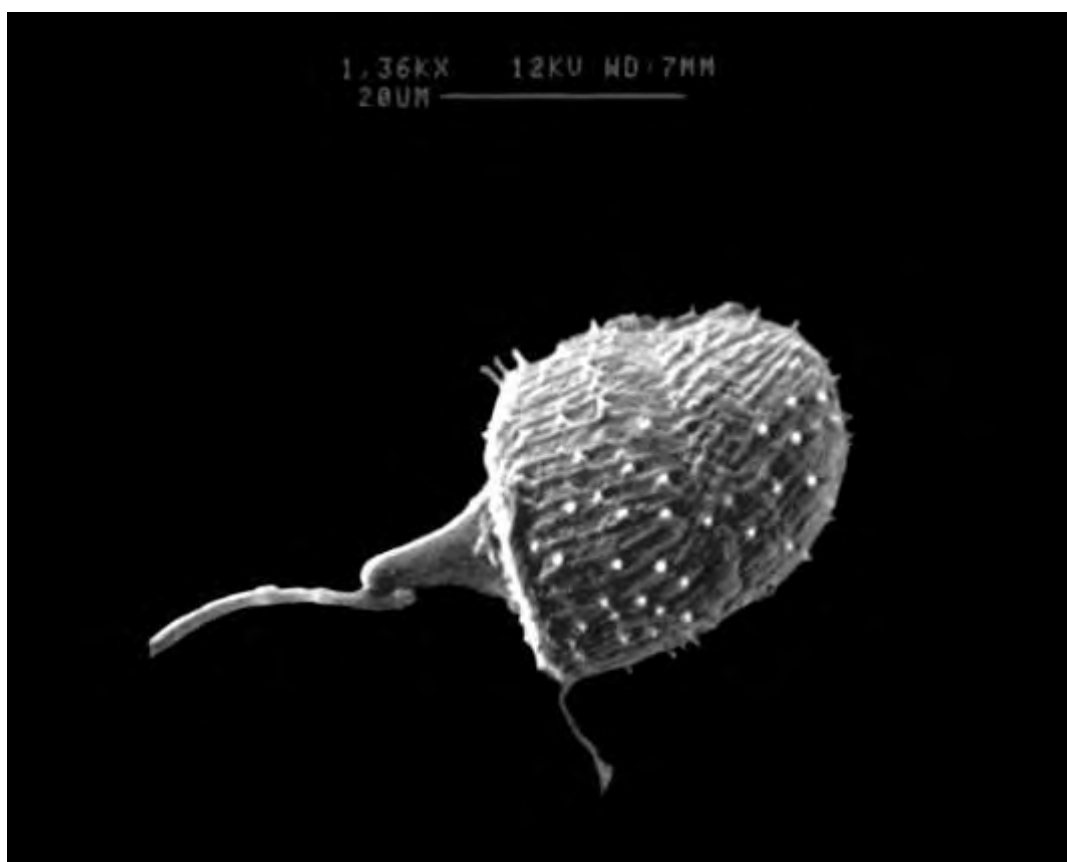
**Εικόνα9:** *Nitzschia*



**Εικόνα10:** *Cyclotella*

#### 3.2.2.4. Συνομοταξία Cercozoa

Τα Cercozoa είναι κυρίως ετερότροφα και συναντώνται στο βένθος λιμνών με γλυκό νερό, ενώ σπανιότερα παρασιτούν. Η διατροφή τους, όταν δεν παρασιτούν, περιλαμβάνει μύκητες, βακτήρια αλλά και μικρούς φυτοπλακτονικούς οργανισμούς (Cavalier 2002).



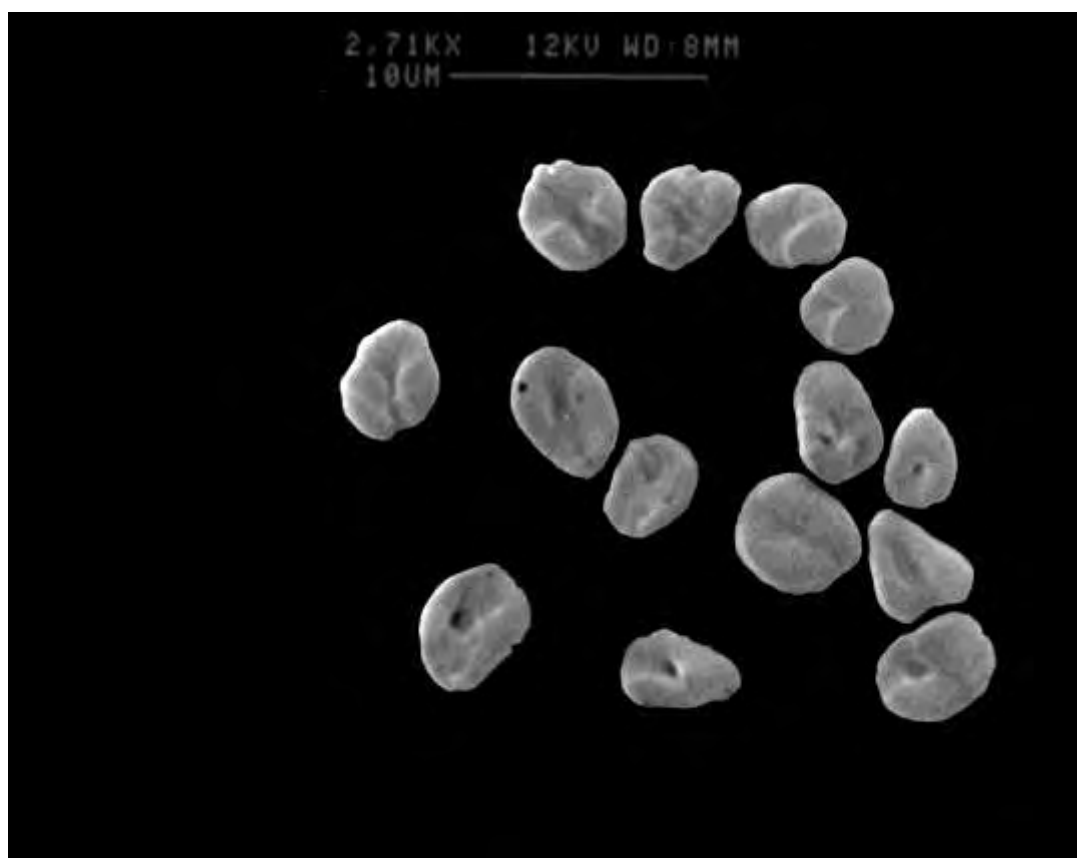
**Εικόνα11:** *Protaspis*

Το *Protaspis*, από τις αρχές του 1900 που ανακαλύφθηκε, βρισκόταν ταξινομικά ανάμεσα στα euglenozoa (ευγλήνες) και τα δινομαστιγωτά λόγω δομής και μεγέθους, όπου το 2004 οι Mylnikov και Karpov, το τοποθέτησαν στα Cercozoa.

Απαντάται κυρίως σε βενθικά οικοσυστήματα με γλυκό νερό αλλά και σε πλαγκτικές μικροκοινωνίες. Υπάρχουν περίπου 10 είδη *Protaspis* τα οποία παρουσιάζουν διαφορετικές συνήθειες και μέγεθος. Η κοινή μορφολογία τους βοηθά στην αναγνώριση του γένους (Silvia 1980). Στην λίμνη Κάρλα βρέθηκε τον μήνα Νοέμβρη (KRL09).

### 3.2.2.5. Συνομοταξία Haptophyta

Τα Haptophyta είναι τα πιο πρόσφατα μελετημένα είδη, καθώς μόλις πρόσφατα, και με βάση την ανάπτυξη στις ιχθυοκαλλιέργειες, έγιναν πειράματα και αναπτύχθηκαν μοντέλα συμπεριφοράς, κυρίως για τα είδη *Pavlova lutheri* και *Isochrysis sp.* (Sato et al. 2009).



**Εικόνα12:** *Prymnesium*

Τα πιο σημαντικά γένη της συνομοταξίας είναι τα *coccolithophora*, λόγω της αφθονίας τους, ενώ εξίσου σημαντικά είναι και τα *Chrysochromulina* και *Prymnesium*, λόγω της τοξικότητάς τους (Andersen 2004).

Το *Prymnesium* είναι αρκετά συνηθισμένο σε παράκτιες περιοχές σε ολόκληρο τον κόσμο, σε νερά με χαμηλή αλατότητα και πληθώρα θρεπτικών. Σε μεγάλες συγκεντρώσεις (water blooms) είναι άκρως επικίνδυνο και τοξικό (Igarashi et al. 1996), καθώς απελευθερώνει τοξίνες (αιμολυτικές, κυτοτοξικές και ιχθυοτοξικές) οι οποίες μπορούν να καταστρέψουν όχι μόνο τους ανταγωνιστές μικροοργανισμούς στο οικοσύστημα, αλλά και τους πληθυσμούς των ιχθύων στη γύρω περιοχή (Edwardsen & Paasche 1998). Στην Κάρλα βρέθηκε τον μήνα Νοέμβρη (KRL09).

#### 3.2.2.6. Συνομοταξία *Cryptophyta*

Τα *Cryptophyta* έχουν παγκόσμια γεωγραφική εξάπλωση, καθώς αναπτύσσονται σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών και αλατότητας. Μπορούν να απαντηθούν σε αλμυρά, υφάλμυρα και γλυκά ύδατα ακόμα και στο χιόνι (Hibberd et al. 1971).

Τα περισσότερα είδη είναι φωτοσυνθετικά (πολλές φορές και ετερότροφα) και αναπτύσσονται σε αλμυρό νερό, ενώ λιγότερα είδη ζουν σε γλυκό νερό. Τέλος σε περιπτώσεις μεγάλης ανάπτυξης ανθίζουν και σχηματίζουν και αυτά μεγάλες ανθίσεις (water blooms), οι οποίες και είναι ακίνδυνες (Klaveness 1988).



**Εικόνα13:** *Cryptomonas*

Το γένος *Cryptomonas*, σε σχέση με τα άλλα γένη *Cryptophyta*, περιορίζεται στο γλυκό νερό και σε χαμηλές θερμοκρασίες, όπου συνήθως ανθίζει. Όταν δεν επιτρέπεται η ανάπτυξη του, σχηματίζει σφαιρικές κύστες (*Microcystis*), εντελώς ακίνδυνες για οποιονδήποτε οργανισμό (Hill 1991). Στην Κάρλα βρέθηκε τον μήνα Ιανουάριο (KRL11)

Στην τροφική αλυσίδα, καθώς φωτοσυνθέτουν (εκτός από ελάχιστα είδη), βρίσκονται χαμηλά και αποτελούν τροφή μικρών ζωοπλακτονικών οργανισμών (Hoef 2005).



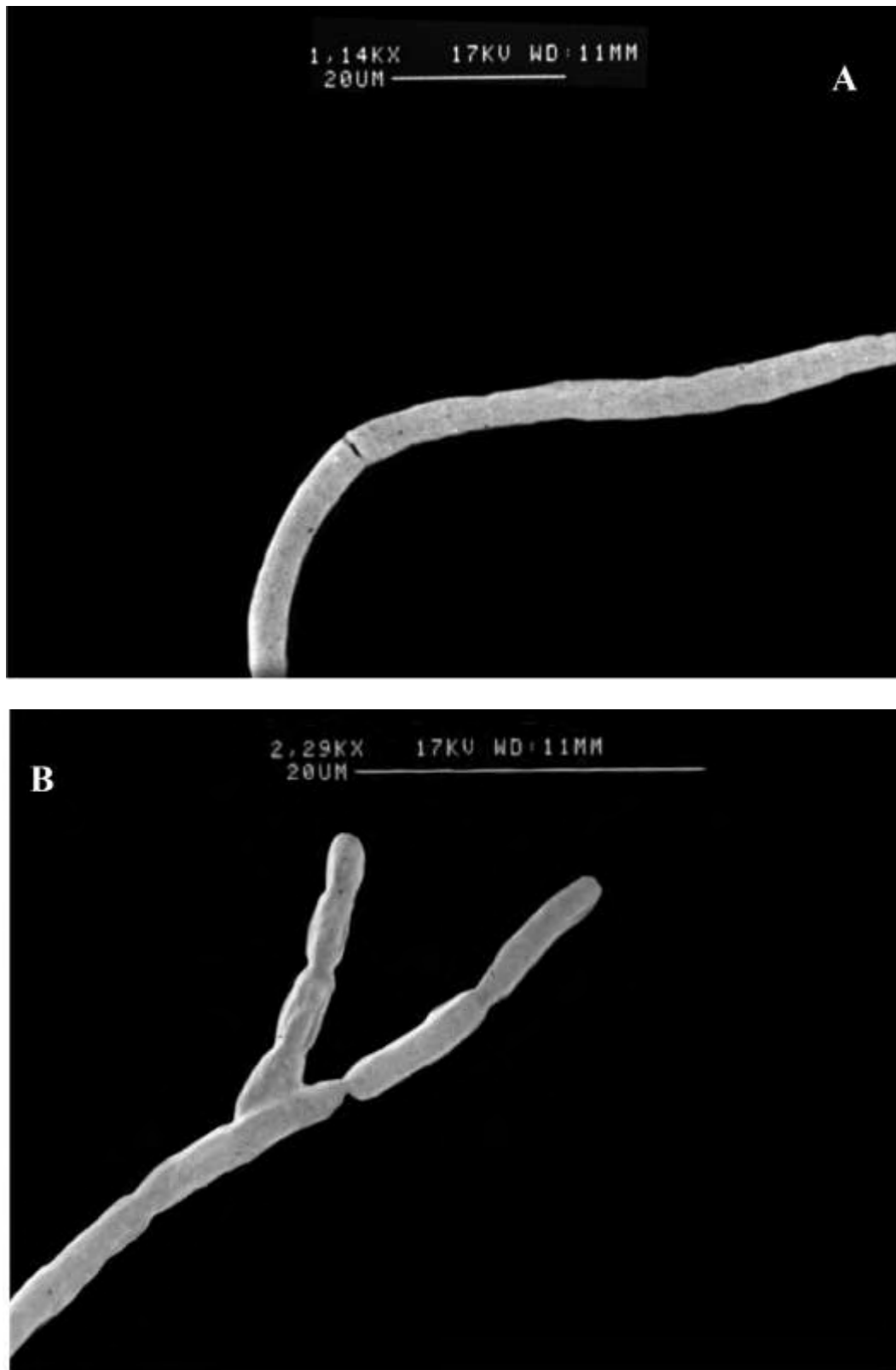
### 3.2.3. Fungi (μύκητες)

Σε αντίθεση με τα πρωτόζωα, με τα οποία έχουν και πολλές άλλες διαφορές, οι μύκητες διαθέτουν κυτταρικά τοιχώματα και παράγουν σπόρια, και τα περισσότερα είδη που έχουν περιγραφεί αποτελούν μια σχετικά ομοιογενή φυλογενετική ομάδα (Madigan 2005).

Οι μύκητες των υδρόβιων συστημάτων περιλαμβάνουν μύκητες που παρασύρθηκαν στο νερό, χερσαίους μύκητες οι οποίοι απελευθερώνουν σπόρια που διασπείρονται στο νερό και είδη αμιγώς υδρόβια (Ingold & Hudson 1993)

Τα ενδιαίτηματα των μυκήτων ποικίλλουν σημαντικά. Ορισμένοι είναι υδρόβιοι και ζουν κυρίως σε γλυκά νερά, λίγοι ζουν στο θαλάσσιο περιβάλλον, ενώ οι περισσότεροι είναι χερσαίοι (Madigan 2005).

Οι μύκητες είναι χημειοργανότροφοι οργανισμοί και γενικά έχουν απλές διατροφικές απαιτήσεις. Πολλά είδη αναπτύσσονται σε ακραία περιβάλλοντα χαμηλού pH ή υψηλής θερμοκρασίας (έως 62 °C), και αυτό μαζί με την πανταχού παρουσία τους, αναδεικνύει τους οργανισμούς αυτούς σε κύριο αίτιο μόλυνσης των τροφίμων, των θρεπτικών μικροβιολογικών μέσων, των υδάτων, αλλά και των περισσότερων επιφανειών (Madigan 2005). Επίσης έχουν θεωρηθεί παραδοσιακώς ως οι σημαντικότεροι αποικοδομητές οργανικής ύλης, κυρίως σε χερσαία οικοσυστήματα, καθώς στα υδάτινα υπερτερούν αριθμητικώς τα βακτήρια. Στις παρακάτω φωτογραφίες αποτυπώνονται κάποιοι μύκητες που βρέθηκαν στην λίμνη Κάρλα κατά τους τρεις μήνες της δειγματοληψίας.



**Εικόνα14-15: (A-B): Fungi**

### 3.3. Προκαρυωτικοί οργανισμοί (Κυανοβακτήρια)

Στη Βιολογία με τον ελληνικό, διεθνή σήμερα όρο προκαρυωτικά ή προκαρυώτες χαρακτηρίζονται τα κύτταρα τα οποία δεν έχουν σχηματισμένο πυρήνα (Gallavotti 1997).

Είναι σχετικά μικρά και περιβάλλονται από πλασματική μεμβράνη ενώ σε ορισμένες ομάδες περικλείονται από κυτταρικό τοίχωμα. Το πυρηνικό υλικό τους ονομάζεται νουκλαιοϊδές και βρίσκεται ελεύθερο στο κυτταρόπλασμα (Sina et al. 2005). Δεν παρατηρείται πυρηνίσκος ενώ το κυτταρόπλασμα αποτελείται κυρίως από ριβοσώματα και μη μεμβρανικά έγκλειστα. Παρά το γεγονός ότι στο κυτταρόπλασμα των πλέον σύνθετων προκαρυωτικών κυττάρων υπάρχουν μικρά μεμβρανικά κυστίδια, εντούτοις δεν παρατηρούνται οργανωμένα οργανίδια, π.χ. μιτοχόνδρια ή χλωροπλάστες, όπως συμβαίνει με τα ευκαρυωτικά κύτταρα (Campbell et al. 2008).

Οι πιο χαρακτηριστικοί προκαρυωτικοί οργανισμοί είναι τα Βακτηριόφυτα ή αλλιώς σχιζομύκητες, αλλά ευρύτερα γνωστά ως βακτήρια (και, όχι τόσο ορθά, βακτηρίδια), τα οποία είναι απλά, συνήθως μονοκύτταρα και έχουν διάφορες δομές, όπως μαστίγια και βλεφαρίδες (Komarek 2005).

Τα περισσότερα βακτήρια που συναντήσαμε στην λίμνη Κάρλα ήταν Cyanobacteria (κυανοβακτήρια). Τα κυανοβακτήρια, αποτελούν φωτοσυνθετικούς μικροοργανισμούς που παλαιότερα, κατά την κλασική ταξινόμηση αναφέρονταν ως «κυανοφύκη». Σήμερα θεωρούνται ιδιαίτερη συνομοταξία στο βασίλειο των Βακτηρίων. Τα κυανοβακτήρια αποτελούν ομάδα φωτοσυνθετικών προκαρυωτών, που θεωρούνται ικανά σε οξυγονογενή ή οξυγονούχο φωτοσύνθεση (Chorus et al. 2000).

#### A. *Cyanobacteria* (Fragments):

Τα κυανοβακτήρια βρίσκονται σχεδόν παντού σε ξηρά και θάλασσα και ειδικότερα σε χώρους με άπλετο φωτισμό. Μερικά είδη αυτών ζουν σε τελείως αφιλόξενα περιβάλλοντα, όπως ακόμη και σε θερμοπηγές όπου η θερμοκρασία υπερβαίνει τους +85 °C (Castenholz 2001). Τα κυανοβακτήρια ευθύνονται για ένα μεγάλο ποσοστό του φωτοσυνθετικού οξυγόνου, ιδιαίτερα στους ωκεανούς, και συμβάλουν κατά πολύ στη δέσμευση του διοξειδίου του άνθρακα και του αζώτου, με ανεξάρτητες του φωτός και της φωτοσύνθεσης αντιδράσεις (Madigan et al. 2007).

Πολλές φορές συγκεντρώνονται σε μεγάλους αριθμούς κατόπιν υπερβολικής ανάπτυξης σε επιφάνειες λιμνών, υδατοδεξαμενών και διακρίνονται σαν πράσινοι επιπλέοντες κόκκοι. Αυτές οι μεγάλες συγκεντρώσεις των κυανοβακτηρίων είναι γνωστές με τον όρο «water blooms» και χαρακτηρίζονται τόσο από πυκνό αριθμό κυττάρων διασκορπισμένων στο νερό όσο και από τον σχηματισμό στρωμάτων στην επιφάνεια. Μπορεί και να απελευθερώσουν τοξίνες, γνωστές ως κυανοτοξίνες (Nagarajan 2011). Στις παρακάτω εικόνες αποτυπώνονται τα κυανοβακτήρια που βρέθηκαν στην λίμνη Κάρλα και τους τρεις μήνες της δειγματοληψίας.

#### B. Γένος *Anabaneopsis*:

Το *Anabaneopsis* είναι ένα αρκετά κοινό κυανοβακτήριο το οποίο απαντάται σε γλυκά νερά και σε σχετικά υψηλές θερμοκρασίες με βασικό pH (7,0-10,5) (Kleber et al. 2011), σύμφωνα και με τις μετρήσεις των αβιοτικών παραγόντων στην παρούσα μελέτη. Αναπτύσσεται και ανθίζει (water blooms)

κατά την διάρκεια της άνοιξης και του καλοκαιριού (Ballot et al. 2008). Τέλος κάποια είδη του, όπως το *A. Elenkinii*, φέρονται να είναι τοξικά.

#### C. Γένος *Anabaena*:

Οι ικανότητες του *Anabaena*, να χρησιμοποιεί μοριακό άζωτο μαζί με τη ικανότητά της να φωτοσυνθέτει, την καθιστούν, σε σχέση με άλλους μικροοργανισμούς, ως τον πιο ολοκληρωμένο αυτότροφο μικροοργανισμό που υπάρχει (Emerson & Lewis 1942). Η ανάπτυξή του είναι συνήθως αργή, με ελάχιστες εξαιρέσεις εξαιρετικά γρήγορης ανάπτυξης, όταν συνδυάζονται αυτές οι δύο ικανότητες (Kratz & Myers 1954). Τέλος, η ικανότητά του να χρησιμοποιεί το μοριακό άζωτο, την καθιστά αρκετά χρήσιμη στο θαλάσσιο περιβάλλον αλλά και συνάμα, εμπορικά χρήσιμο ως αντικαταστάτη χημικών λιπασμάτων.

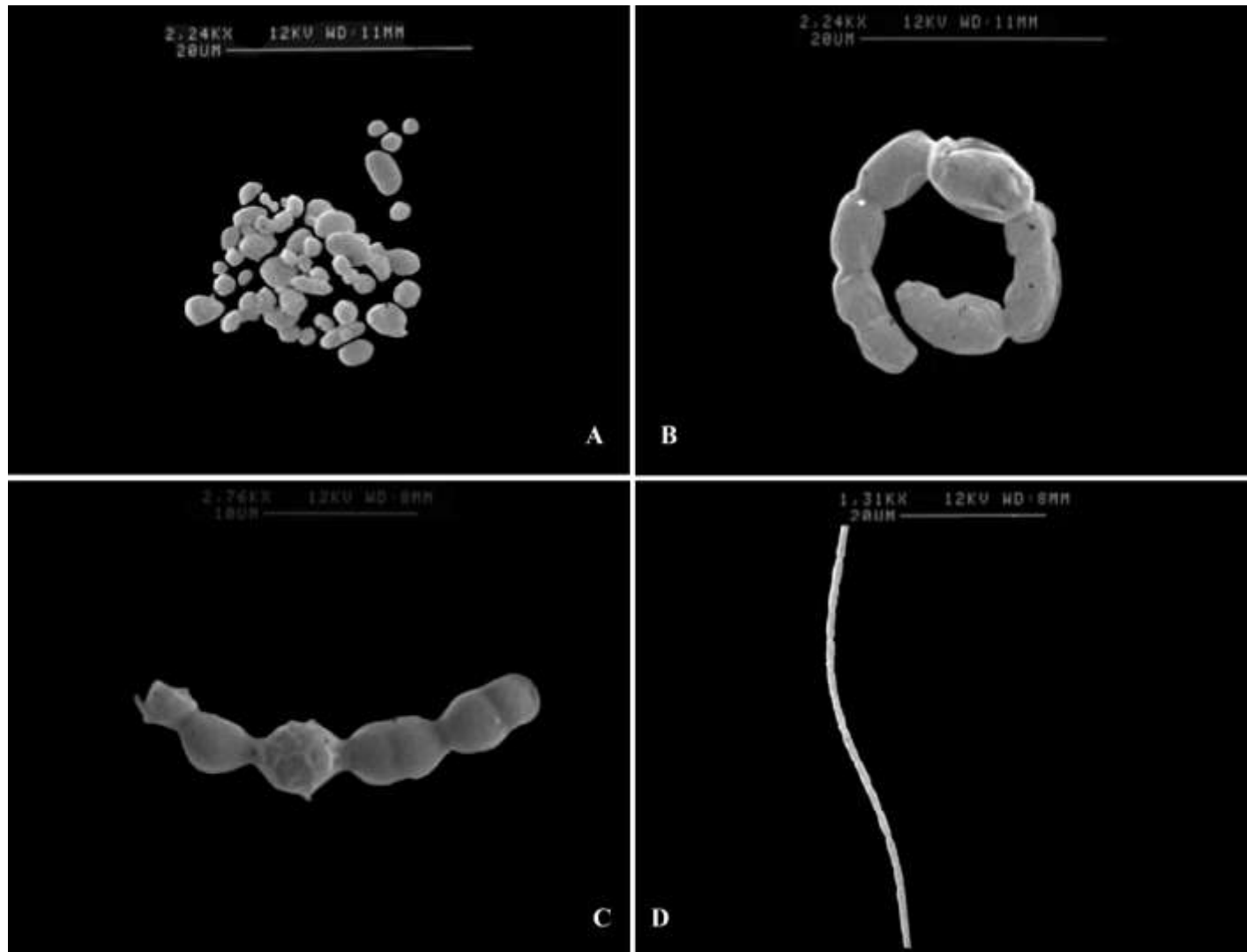
#### D. Γένος *Pseudanabaena*:

Είναι δύσκολο να περιγραφεί το γένος αυτό, καθώς τα είδη που το συγκροτούν έχουν πολλές και διαφορετικές συνήθειες,. Πολλά είδη του είναι πλαγκτικά, άλλα βενθικά, κάποια ολιγότροφα, άλλα μεσότροφα και άλλα εύτροφα. Συναντώνται συχνά σε λίμνες και δεξαμενές, ενώ άλλα είδη αναπτύσσονται στο έδαφος (Thomazeau 2010). Τα περισσότερα ζούν και αναπτύσσονται κυρίως σε χαμηλές θερμοκρασίες και γλυκό νερό, καθώς λίγα είδη είναι γνωστά ότι βρίσκονται σε ακραίους βιότοπους. Τέλος, ως κυανοβακτήρια, ανθίζουν χωρίς να είναι επικίνδυνα. (Acinas 2009)

#### E. *Microcystis*:

Πολλά είδη κυανοβακτηρίων είναι γνωστό ότι σχηματίζουν ισχυρούς αναστολείς πρωτεϊνών, γνωστοί και ως *Microcystis* (μικροκυστίνες), οι οποίες ως επί το πλείστον είναι τοξικές (Carmichael 1994). Από τα πιο τοξικά είδη, θεωρείται το *Microcystis aeruginosa*, το οποίο παράγει μια ισχυρή ηπατοτοξίνη και μπορεί να προκαλέσει βλάβες ακόμα και θάνατο, στον άνθρωπο (Sivonen et al. 1995).

Όλες οι μικροκυστίνες θεωρούνται προς το παρόν ενδοτοξίνες. Άγνωστο παραμένει το γεγονός ότι διάφορα στελέχη της *Microcystis aeruginosa* και άλλων μικροκυστών, παραδόξως, δεν παραγουν τοξινές σε σχέση με τις υπόλοιπες, και είναι τελείως ακίνδυνα (Carmichael 1994).



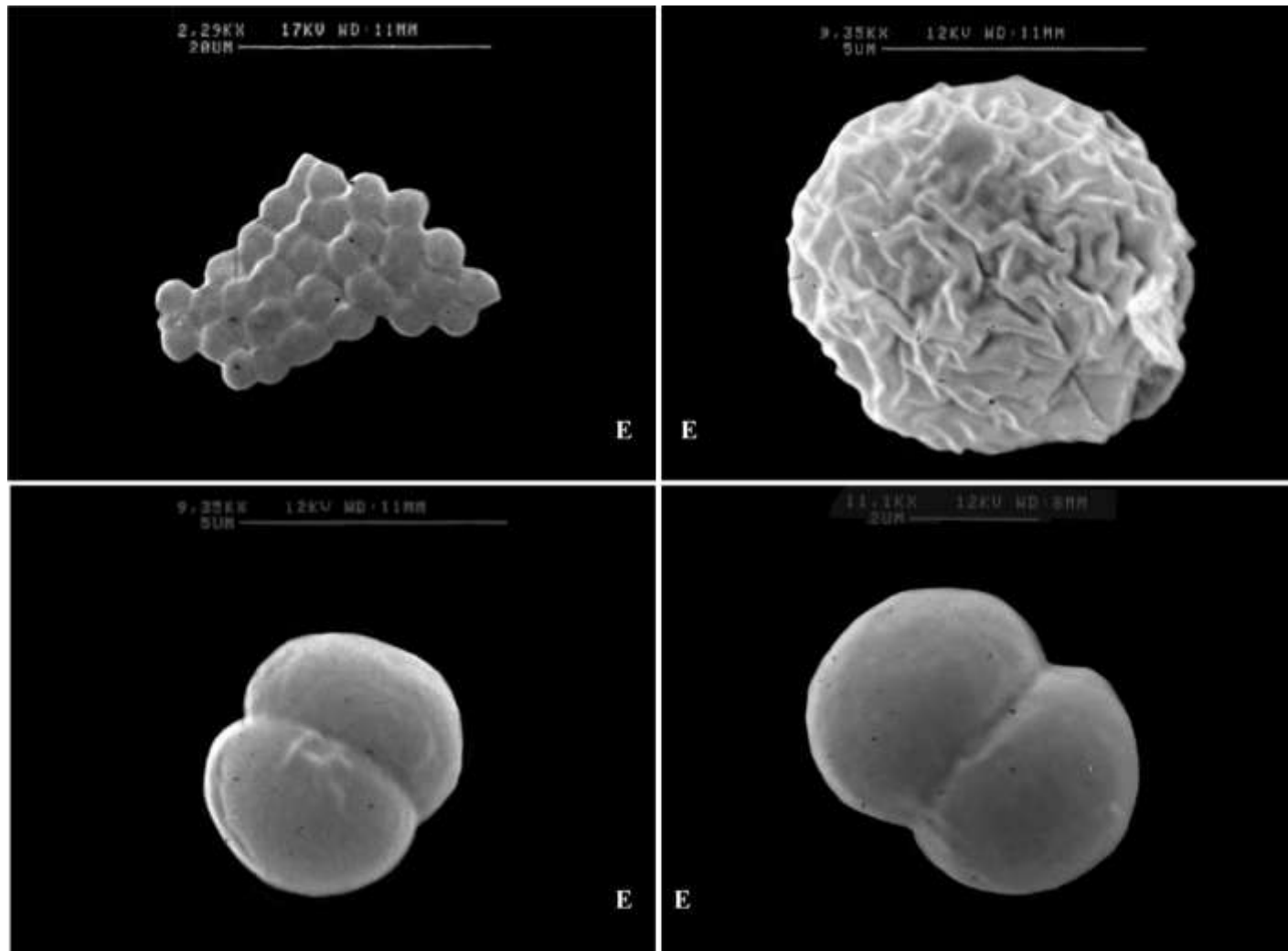
**Εικόνα16:**

(A): *Cyanobacteria* (Fragments)

(B): *Anabaneopsis*

(C): *Anabaena*

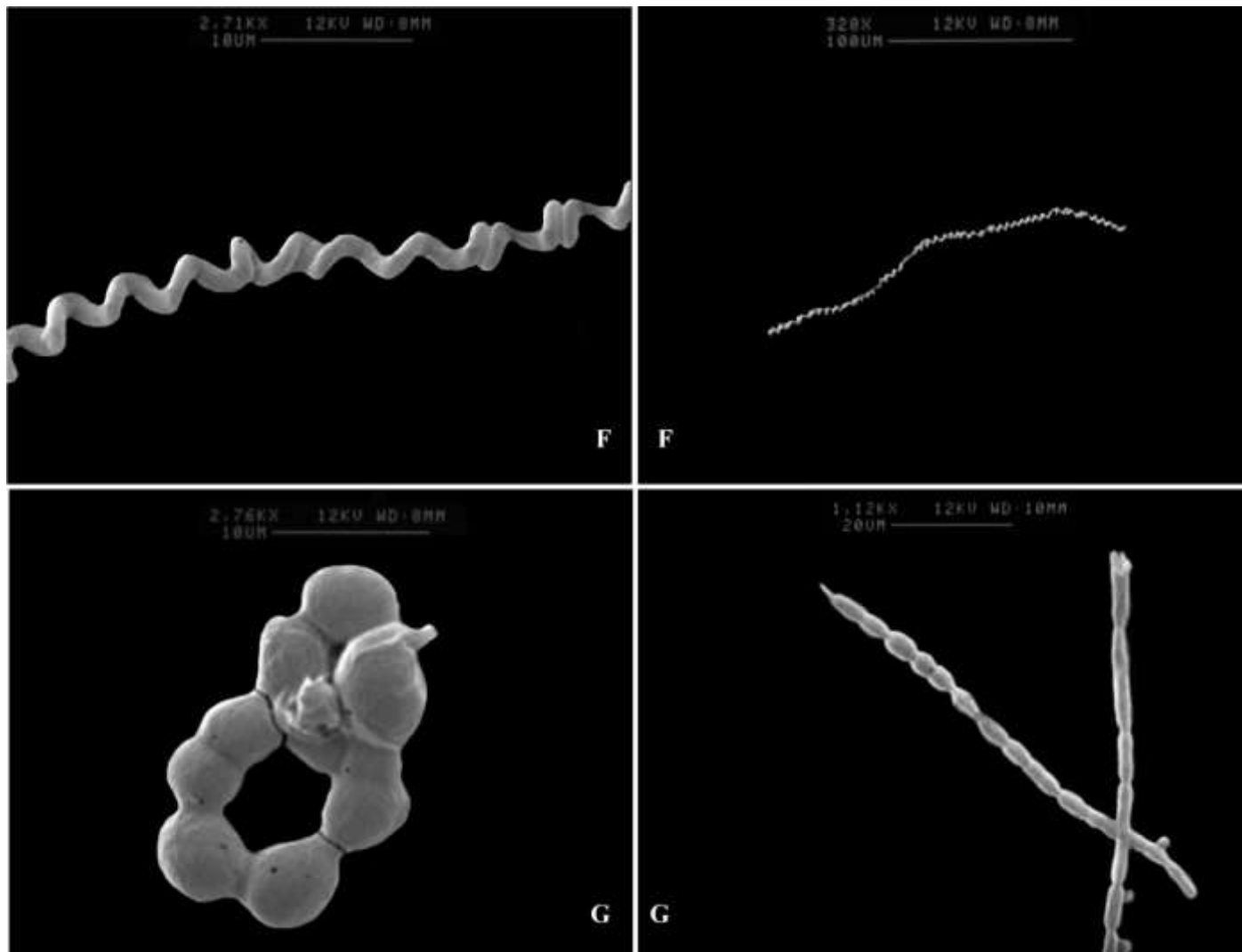
(D): *Pseudanabaena*

**Εικόνα17:****(E):** *Microcystis*



F. Γένος *Arthrospira*:

Το *Arthrospira maxima*, παλαιότερα *Spirulina maxima*, είναι επίσης φωτοσυνθετικό κυανοβακτήριο. Χρησιμοποιείται στην βιομηχανία παραγωγής συμπληρωμάτων διατροφής, αλλά και στην προσπάθεια δημιουργίας οικονομικά βιώσιμων βιοκαυσίμων (Carrieri 2009). Συναντάται σε θερμά νερά (τροπικά-υποτροπικά) με βασικό pH και περίσσιο διοξείδιο του άνθρακα, όπως στην λίμνη Κάρλα (Ciferri 1983). Η *Arthrospira* βρέθηκε μόνο τον Ιανουάριου του 2011 (KRL11).



Εικόνα18:

(F): *Arthrospira*,(G): *Anabaena*

### 3.4. Άλλες μελέτες για την λίμνη Κάρλα.

Οι οργανισμοί που βρέθηκαν στην παρούσα έρευνα και αναλύθηκαν παραπάνω είναι μόνο ένα κομμάτι από το πλήθος των μικροοργανισμών που έχουν βρεθεί και αναγνωριστεί μέχρι σήμερα στην λίμνη Κάρλα.

Συγκεκριμένα τρεις μελέτες προηγήθηκαν της παρούσας, με αφορμή δυο περιστατικά μαζικών θανάτων των ιχθύων τον Μάρτιο και Απρίλιο του 2010, η πρώτη ήταν των Οικονομου et al. (2012) τους μήνες Μάρτιο και Απρίλιο του 2010, η δεύτερη των Papadimitriou et al. (2013) από τον Απρίλιο μέχρι τον Οκτώβριο του 2010 και συμπληρωματικά η μελέτη των Nikouli et al. (2013), με εποχικές δειγματοληψίες (Μάιος, Αύγουστος και Νοέμβριος του 2010), για να ακολουθήσει η παρούσα, τους μήνες Νοέμβριο και Δεκέμβριο του 2010, καθώς και τον Ιανουάριο του 2011.

Αρχικά στην έρευνα των οικονομου et al. (2012), έγιναν δυο δειγματοληψίες (17 Μαρτίου και 20 Απριλίου), των οποίων τα δείγματα εξετάστηκαν με ορετικούς τρόπους. Αρχικώς μέσω αναλύσεων DNA (18S/16S), κατά την οποία αναγνωρίστηκαν τα γένη (κατα προσέγγιση) των μικροοργανισμών που υπήρχαν στη λίμνη εκείνη την περίοδο, και αργότερα μέσω παρατήρησης σε ανάστροφο μικροσκόπιο αντίθετης φάσης (Nikon SE 2000) το είδος των μικροοργανισμών.

Αναλυτικά τα φύλα που εντοπίστηκαν μέσω της ανάλυσης του DNA, ήταν τα Chlorophyta, τα Cercozoa, τα Heterokontophyta (stramenopiles), τα Euglenophyta, τα Haptophyta, τα Cryptophyta, τα Cyanobacteria, τα Alveolata και οι μύκητες (Fungi), τα οποία ήταν κοινά στις δυο μελέτες (Οικονομου et al. και παρούσα εργασία), ενώ τα φύλα των Choanoflagellata, Mesomycetozoea και

Katablepharidophyta, βρέθηκαν μόνο στην έρευνα των Oikonomou et al. 2012. Τα Chlorophyta ήταν και στις δυο μελέτες το επικρατές φύλο με πολλά είδη.

Μέσω μικροσκοπικής ανάλυσης εντοπίστηκαν μικροοργανισμοί, όπως το *Cyclotella* sp., το οποίο ήταν και το επικρατέστερο, το *Euglena* sp. και το *Prymnesium parvum*, τα οποία επίσης βρέθηκαν στην παρούσα εργασία, και πιθανώς να υπήρχαν από τότε στην υδάτινη στήλη, ενώ άλλοι, όπως το *Apedinella radians* και το *Gymnodinium beii*, σταμάτησαν να εμφανίζονται στις δειγματοληψίες.

Στην μελέτη των Papadimitriou et al. (2013), οι δειγματοληψίες έλαβαν χώρα τους μήνες Απρίλιο – Οκτώβριο του 2010, ενώ ταυτόχρονα συλλέχθηκαν και δέκα ιχθύες (*C. carpio*) από την λίμνη, με σκοπό την μελέτη του ήπατος, του εγκεφάλου, των μυών των νεφρών και του πίσω μέρος του παχέος εντέρου.

Η μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η μικροσκοπική αναγνώριση σε ανάστροφο μικροσκόπιο αντίθετης φάσης (Nikon SE 2000) και η ELISA. Στα αποτελέσματά τους εντοπίστηκαν 66 διαφορετικά είδη μικροοργανισμών που ανήκουν σε 8 γένη. Επικρατέστερα και σε αυτή τη περίπτωση ήταν τα Chlorophyta, ενώ ακολουθούσαν τα Cyanobacteria με 14 είδη, τα Euglenophyta με 8 είδη, τα Dinoflagellate με 7 είδη, τα Cryptophyta και τα Haptophyta με 2 είδη και τέλος τα Dinophyta και τα Xanthophyta με 1. Με εξαίρεση τα δυο τελευταία γένη, όλα τα υπόλοιπα βρέθηκαν και στην παρούσα μελέτη.

Το επικρατέστερο γένος τους μήνες Ιούνιο μέχρι Σεπτέμβριο ήταν τα Cyanobacteria, με κυρίαρχα είδη το *Anabaenopsis elenkinii*, το οποίο βρέθηκε και στην παρούσα εργασία, το *Sphaerospermopsis aphanizomenoides* και το *Planktothrix agardhii*. Απο τον Απρίλιο μέχρι τον Οκτώβριο επικρατέστερα ήταν τα Dinoflagellate, τα Cryptophyta, τα Haptophyta και τα Euglenophyta, με

χαρακτηριστικά είδη τα *Stephanodiscus* sp, *Cryptomonas* sp., *Prymnesium parvum* και *Euglena* sp. αντίστοιχα, με τα 3 τελευταία είδη να εντοπίζονται και στην παρούσα εργασία. Σε όλα τα δείγματα ανεξαιρέτως, ακόμα και στα δείγματα από τους ιχθύες που συλλέχθηκαν από την λίμνη, παρατηρήθηκε μεγάλος αριθμός μικροκυστίνων (*Microcystis*), των οποίων η συγκέντρωση ήταν μεγαλύτερη τους θερμούς μήνες.

Τέλος, στην μελέτη των Nikouli et al. (2013), οι δειγματοληψίες ήταν εποχιακές και έλαβαν χώρα στο τέλος της άνοιξης (28-05-2010), όταν η θερμοκρασία άρχισε να αυξάνει, στο τέλος του καλοκαιριού (28-08-2010), όπου η θερμοκρασία ήταν μέγιστη και κατά το τέλος του φθινοπώρου (25-11-2010), κατά την οποία η θερμοκρασία άρχισε να μειώνεται. Πέρα από τον παράγοντα της θερμοκρασίας η επιλογή του χρόνου των δειγματοληψιών έγινε και με βάση τις ανθίσεις των Cyanobacteria (κυανοβακτηρίων).

Οι αναλύσεις DNA (18S) έδειξαν την παρουσία Mesomycetozoa, Alveolata, Stramenopiles, Fungi, Chlorophyta, Cercozoa και Cryptophyta, με τα 4 τελευταία να εντοπίζονται και στην παρούσα εργασία. Όσον αφορά τους μικροοργανισμούς, αναγνωρίστηκαν είδη *Anabaena*, *Cercozoa*, *Aphanizomenon*, *Dinoflagellates* Fungi Mesomycetozoa και *Microcystis*, όπως τα *Pfiesteria piscicida*, *Cryptomonas curvata*, *Nodularia spumigena* κ.α. Παρ'ολ'αυτά εντύπωση προκάλεσε το γεγονός ότι το *Prymnesium parvum* δεν εντοπίστηκε, κάτι που έρχεται σε αντιδιαστολή με τα ευρήματα των Oikonomou et al. (2012) και Papadimitriou et al. (2013).

Εν κατακλείδι από το πλήθος των μικροοργανισμών που εντοπίστηκαν την περίοδο Μαρτίου – Νοεμβρίου του 2010 από τους Oikonomou et al. (2012), Papadimitriou et al. (2013), Nikouli et al. (2013) και την παρούσα μελέτη

(Νοέμβριο-Ιανουάριου του 2010-2011), ένα σημαντικά μεγάλο ποσοστό ήταν τοξικά και πιθανώς τοξικά.

Φύλα όπως το Alveolata, Mesomycetozoea και Haptophyta μαζί με κάποια Cyanobacteria, καθώς και μικροοργανισμοί όπως το *Planktothrix* cf. *agardhii*, *. piscicida*, *Prymnesium parvum*, *anabaenopsis elenkinii*, το *Pfiesteria* cf. και άλλα, τα οποία είναι ικανά να παράγουν τοξίνες αλλά και να δημιουργούν ευτροφικές συνθήκες, είναι πολύ πιθανό -έως σίγουρο- να έπαιξαν σημαντικό ρόλο στους μαζικούς θανάτους των ιχθύων, και αναμένεται στη συνέχεια της πορείας της λίμνης να παίξουν εξίσου σημαντικό ρόλο στην αποκατάσταση της αρχικής και φυσικής της μορφής.

## 4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### 4.1.Ελληνόφωνη

- Αρώνη Α. (2008) Χρήση φυκών ως βιοδείκτες για τον έλεγχο τοξικότητας από ζιζανιοκτόνα, μεταπτυχιακή εργασία, Αθήνα.
- Ελληνική Φυκολογική Εταιρία (2008) Μια βουτιά, μια ματιά στους κήπους του νερού, εκδ. Σταμούλη, Αθήνα.
- Επίσημη Εφημερίδα Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων (1996) L 206, σ. 0007-0050.
- Επίσημη Εφημερίδα Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων (1996) L 103, σ. 0001-0018.
- Κοντογιαννάτου Τ. (2012) Ασβεστικά Ροδοφύκη στο Αιγαίο Πέλαγος (Τραγάνα), Πτυχιακή Εργασία, Πάτρα.
- Μαργαριτη Μ. (2011) Η ανασύσταση της λίμνης Κάρλας, Αειφορική διαχείριση των υδατικών πόρων, Πρακτικά Ημερίδας για την Κάρλα απο τον Φορέα και το Τ.Ε.Ε., Βόλος.
- Μαυρικάκη Ε., Γκούβρα Μ., Καμπούρη Α. (2009) Βιολογία Γ' Γυμνασίου, ΟΕΔΒ, Αθήνα.
- Παπακώστα Ε. (2010) Υδρολογικές και υδρογεωλογικές συνθήκες της υδρολογικής λεκάνης της Κάρλας και σχεδιασμός ορθολογικής διαχείρισης των υδάτινων πόρων, Μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία, Αθήνα.
- Παπακωσταντίνου Κ. & Σμπαρούνης Θ. (2008) Περιβαλλοντική εκπαίδευση σε Προστατευόμενες Περιοχές με Φορείς Διαχείρισης: Παρούσα κατάσταση, Προκλήσεις & Προοπτικές. Πρακτικά 4<sup>ο</sup> Συνεδρίου ΠΕΕΚΠΕ, Ναύπλιο.

- Ρούσκας Ι. (2001) Η επιστροφή της Κάρλας, εκδ. Πρωτοπορία, Αθήνα.
- Σγούντζος Ι. (2007) Μελέτη της κινητικής ανάπτυξης μικροοργανισμών κατα την βιοαποδόμηση τοξικών ρύπων σε πορώδη μέσα. Διδακτορική Διατριβή, Πάτρα.
- Φρυδάς Δ. (2000) Εξέλιξη και οικολογία των φυκών και του φυτοπλαγκτού, εκδόσεις Πανεπιστημίου Πατρών. Πάτρα.
- Χατζηχαράλαμπους Ε., Μιχαλάτου Ε., Σεφερλής Μ., Λιόντα Χ., Αναγνωστοπούλου Μ. (2003) Διεθνές & Ευρωπαϊκό Θεσμικό Πλαίσιο, α/α 7, σελ. 147-175.
- Campbell N. A., Reece J. B., Urry L. A., Cain M. L., Wasserman S. A., Minorsky P. V., Jackson R. B. (2008) Βιολογία, μηχανισμοί της εξέλιξης-εξελικτική ιστορία της βιολογικής ποικιλότητας, πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, Κρήτη.
- Gallavotti B. (1997) Τα έξυπνα βιβλία της επιστήμης, τόμος 9: τα μυστικά της ζωής, σ. 13, Αθήνα.
- Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J. (2005) Βιολογία των Μικροοργανισμών (απο μετάφραση), πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης.
- Wetzel R. (2006) Λιμνολογία. Λιμναία και ποτάμια οικοσυστήματα. Εκδ. Κωσταράκη, Αθήνα.



## 4.2. Ξενοφώνη

- Acinas S. G., Haverkamp T. H. A., Huisman J., Stal L. J. (2009) Phenotypic and genetic diversification of *Pseudanabaena* spp (cyanobacteria), The ISME Journal 3, 31–46.
- Ahluwalia A. Σ., Phycology: Principles, Processes and Applications, Daya Publishing House, 2003.
- Aletsee L. and Jahnke J., (1992) Growth and productivity of the psychrophilic marine diatoms *Thalassiosira antarctica* Comber and *Nitzschia frigida* Grunow in batch cultures at temperatures below the freezing point of sea water, Polar biology 11:643-647.
- Ananiadis C. I. (1956) Limnological study of lake Karla, Bull Inst. Oceanogr. 1083: 1-19.
- Andersen, R. A. (2004) Biology and systematics of *heterokont* and *haptophyte* algae.
- Apostolou K. O. (1979) the Topography of Feres Region, Thessaly, During Prehistoric Period.
- Ashrafi B. (1999) Taxonomic studies of terrestrial yellow-green (*Heterokontophyta*, *xanthophyceae*) and green (*Chlorophyta*) algae from the Ross Sea regions, Antarctica. University of Canterbury. Canterbury.
- Ballot A., Dadheech P. K., Haande S., Krienitz L. (2008) Morphological and phylogenetic analysis of *Anabaenopsis abijatae* and *Anabaenopsis elenkinii* (nostocales, cyanobacteria) from tropical inland water bodies. Microb Ecol. 55(4):608-18.

- Brosnan, S., Brown, J. P., Farmer, M. A., Triemer, R. E. (2005). Morphological separation of the euglenoid genera *Trachelomonas* and *Strombomonas* (*Euglenophyta*) based on lorica development and posterior strip reduction, *Journal of Phycology* 41: 590-605.
- Burki F, Shalchian-Tabrizi K, Minge M, Skjæveland Å, Nikolaev SI, et al. (2007) Phylogenomics Reshuffles the Eukaryotic Supergroups. *PLoS ONE* 2(8): e790.
- Carrieri D. J. (2009) physiological control of photosynthesis and fermentation in the *cyanobacterium Arthrospira (spirulina maxima* CS-328), for biofuel production, princeton university, Princeton.
- Carmichael W. W. (1994) The toxins of Cyanobacteria, *Sci. Am.* 270: 78-86.
- Castenholz R. W. (2001) General characteristics of the cyanobacteria, Springer-Verlag 1: 539-562.
- Cavalier S. T. (2002) The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification of Protozoa, *International Journal of Systemic Evolution Microbiology* 52: 297-354.
- Chodat, R. (1895) *Materiaux pour servir a l'histoire des Protococcoidées II*, *Bulletin de l'Herbier Boissier* 3: 109-114.
- Chorus I., Falconer I.R., Salas H.J., Bartram J., (2000) Health risks caused by freshwater *Cyanobacteria* in recreational waters, *Journal of Toxicology and Environmental Health* 1: 323-327.
- Ciferri, O. (1983). *Spirulina, the edible microorganism*, *Microbiological reviews* 47(4): 551–578.

- Ciugulea, I. Nudelman, M. A., Brosnan, S., Triemer, R. E. (2008). Phylogeny of the euglenoid loricate genera *Trachelomonas* and *Strombomonas* (*Euglenophyta*) inferred from nuclear SSU and LSU rDNA, .Journal of Phycology 44(2): 406-418.
- Clark R. F., Williams S. R., Nordt S. P., Manoguerra A. S. (1999) A Review of Selected Seafood Poisonings, Undersea Hyperbaric Medicine 26(3): 175–184.
- Edvardsen B., Paache E. (1998) Bloom dynamics and physiology of *Prymnesium* and *Chrysochromulina*. In: Anderson DM, Cembella AD, Hallegraeff GM (eds) Physiological ecology of harmful algal blooms. NATO ASI Ser Ser G 41:193–208.
- Emerson R., Lewis C. M. (1942) The photosynthetic efficiency of phycocyanin in *Chroococcus* and the problem of carotenoid participation in photosynthesis, Jour. Gen. Physiol. 25: 579-595.
- Goldstein J., Newbury D., Joy D., Lyman C., Echlin P., Lifshin E., Sawyer L., Michael J. (2003) Scanning electron microscopy and x-ray microanalysis. Springer.
- Gonzales L. E., Canizares R. O., Baena S. (1997) Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a Colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*, Bioresource Technology 60(3): 259–262.
- Hessen D. O., Van Donk E. (1993) Morphological changes in *Scenedesmus* induced by substances released from *Daphnia*, Arch. Hydrobiology 127(2): 129-140.

- Hibberd D.J., Greenwood A.D., Griffiths H.B. (1971) Observations on the ultrastructure of the *flagella* and periplast in the *Cryptophyceae*, Br Phycol J. 6: 61-72.
- Hill D. (1991) A revised circumscription of *Cryptomonas* (Cryptophyceae) based on examination of Australian strains. Phycologia 30: 170-188.
- Hoef E. K. (2005) Multiple independent losses of photosynthesis and differing evolutionary rates in the genus *Cryptomonas* (Cryptophyceae): Combined phylogenetic analyses of DNA sequences of the nuclear and nucleomorph ribosomal operons, J. Mol. Evol. 60: 183-195.
- Igarashi T., Satake M., Yasumoto T. (1996) Prymnesin-2: a potent ichthyotoxic and hemolytic glycoside isolated from the red tide alga *Prymnesium parvum*, J Am Chem Soc 118: 479-480.
- Ingold C. T., Hudson H. J. (1993) the biology of fungi, Chapman Hall, Londol.
- Klaveness D. (1988) Ecology of the *Cryptomonadida*: A First Review. In Sandgren CD (ed.) Growth and Reproductive Strategies of Freshwater Phytoplankton. Cambridge University Press, Cambridge, pp 105-133.
- Kleber R. de S. S., Fernanda R. J., Célia L. S. A. (2011) Effects of the pH on growth and morphology of *Anabaenopsis elenkinii* Miller (Cyanobacteria) isolated from the alkaline shallow lake of the Brazilian Pantanal, Fottea 11(1): 119–126.

- Komarek J. (2005) The modern classification of *Cyanoprokaryotes* (Cyanobacteria), Ocean. Hydrob. Studies 34: 5-17.
- Kotpal R. L. (2009) modern Text Book of Zoology Invertebrates, Rastogi Publications, New Delhi. σ. 150-170.
- Kratz W., Myers J. (1954) Growth and characteristics of two blue-green algae, Presented before the Amer, Soc. of Plant Physiol., Gainesville, Florida.
- Lapidou C., Vaina V. (2009) Ecosystem modeling of sediment dynamics in the constructed wetland Carla in Central Greece. Int. J. Design Nature Ecodyn. 3:273-280.
- Lee R. E. (2008) Phycology. 4th Edition. Cambridge University Press, Cambridge.
- Mc Mullan D. (1953) An improved scanning electron microscope for opaque specimens. Proc Inst Electr Engrs 100(II): 245-259.
- Mc Mullan D. (1995) Scanning electron microscopy 1928–1965, Scanning 17(3): 175–185.
- Moumou Ch., Vouvalidis K., Pechlivanidou S., Nikolaou P. (2010) The Fluvialaction of the Karla Basin Sterams in a Natural and Man-made Environment, Bulletin of the Geological Society of Greece, Proceedings of the 12<sup>th</sup> International Congress, pp:706-714.
- Murata K. (1974) Spatial distribution of backscattered electrons in the scanning electron microscope and electron microprobe, Journal of Applied Physics 45: 4110-4117
- Mylikov A. P. & Karpov S. A. (2004) Review of diversity and taxonomy of cercomonads. Protistology. 3:201-217.

- Nagarajan M., Maruthanayagam V., Sundararaman M. (2011). A review of pharmacological and toxicological potentials of marine cyanobacterial metabolites, *Journal of Applied Toxicology* 32(3): 153–185.
- Nikouli E, Kormas K, Berillis P, Karayanni H, Moustaka-Gouni M (2013) Harmful and parasitic unicellular eukaryotes persist in a shallow lake under reconstruction (L. Karla, Greece). *Hydrobiologia* 718:73-83
- Oakley C. W. (1982) the early history of the scanning electron microscope. *Journal of Applied Physics* 53(R), 1-13.
- Oikonomou A., Katsiapi M., Berillis P., Moustaka G. M., Kormas K. Ar. (2010) Microbial gangs take over the water column of a reconstructed lake, 14<sup>th</sup> International Conference on Harmful Algae, Crete, Greece.
- Oikonomou A, Katsiapi M, Karayanni H, Moustaka-Gouni M, Kormas KA (2012) Plankton microorganisms coinciding with two consecutive mass fish kills in a newly reconstructed lake. *The Scientific World Journal* 2012:Article ID 504135.
- Papadimitriou T, Katsiapi M, Kormas KA, Moustaka-Gouni M, Kagalou I (2013) Artificially-born "killer" lake: Phytoplankton based water quality and microcystin affected fish in a reconstructed lake. *Science of the Total Environment* 452-453:116-124.
- Patterson D. J. (1996) *Free-Living Freshwater Protozoa*. John Wiley & Sons, Inc.

- Peters KR (1982) Conditions required for high quality high magnification images in secondary electron-I scanning electron microscopy, *Scanning Electron Microscopy* 4: 1359-72.
- Reimer L (1987) Scanning Electron Microscopy, Physics of Image Formation and Microanalysis, *Journal of Basic Microbiology* 27(3):166.
- Reynolds C. S., Walsby A. E. (1997) Water-blooms, *Biol. Rev.* 50:437-481
- Riisberg I., Orr R. J., Kluge R. (2009) Seven gene phylogeny of *heterokonts*, *Protist* 160(2): 191–204.
- Satoh M., Iwamoto K., Suzuki I., Shiraiwa Y. (2009) Cold stress stimulates intracellular calcification by the coccolithophore, *Emiliana huxleyi* (Haptophyceae) under phosphate-deficient conditions, *Marine Biotechnology* 11(3): 327–33.
- Scheffer M. (2004) Ecology of shallow lakes, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Sina M. A., Simpson A. G. B., Farmer M. A., Andersen R. A., Anderson O. R., Barta J. R., Bowser S. S., Brugerolle G., Fensome R. A., Fredericq S., Jamew T. Y., Karpov S., Kungrens P., Krug J., Lane C. E., Lewis L. A., Lodge J., Lynn D. H., Mann D. G., Mc Court R. M., Mendoza L., Moestrup J., Mozley S. E. S., Nerad T. A., Shearer C. A., Smirnov A. V., Spiegel F. W., Taylor M. F. J. R (2005) The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists, *Journal of Eukaryotic Microbiology* 52 (5): 399-451.

- Silvia P. C. (1980) Names of Classes and Families of Living Algae, Bohn, Sheltema & Holkema, Utrecht.
- Sinoven K., Namikoshi M., Luukainen R., Fardig M., Rouhiainen L., Evans W. R., Carmichael W. W. Rinehart K. L. Niemela S. I. (1995) Variation of Cyanobacterial Hepatotoxins in Finland. In the Contaminants in the Nordic Ecosystem: Dynamics, Processes and Fate. Amsterdam: SPB Academic Publishing, pp. 163-169
- Steidinger K. A., Burkholder J. M., Glasgow H. B., Hobbs C. W., Garrett J. K., Truby E. W., Noga E. J., Smith S. A. (1996) *Pfiesteria piscicida* Gen. Et sp. Nov. (Pfiesteriaceae Fam), A new toxic dinoflagellate with a complex life cycle and behavior, J. Phyol. 32, 157-164.
- Stoecker, D. K. (1999) Mixotrophy among Dinoflagellates, The Journal of Eukaryotic Microbiology 46 (4): 397–401..
- Thomazeau S., Houdan F. A., Couté, A., Duval C., Couloux A., Rousseau F., Bernard C. (2010). The contribution of sub-Saharan African strains to the phylogeny of cyanobacteria: focusing on the *Nostacaceae* (Nostocales, Cyanobacteria). Journal of Phycology 46(3): 564-579.
- Tomas, C. R., Eds (1996) Identifying marine diatoms and dinoflagellates. pp. 1-858. San Diego: Academic Press Inc.
- Van Vlaardingen P. L. A., Steinhoff W. J., Admiraal W. A., De Voogt P. (1996) Property-toxicity relationships of azaarenes to the green alga *Scenedesmus acuminatus*, Environmental Toxicology and Chemistry 15(11): 2035–2042.



- Wunsam S. 1., Schmidt R. I., Klee R. (1995) *Cyclotella*-taxa (Bacillariophyceae) in lakes of the Alpine region and their relationship to environmental variables. *Aquatic Sciences* 57(4).
- Zworykin V. A., Hillier J., Snyder R. L. (1942) A scanning electron microscope, *ASTM Bull* 117: 15-23.

#### 4.3.Ηλεκτρονική

- Ινστιτούτο Πληροφοριακών συστημάτων (2011) Το δίκτυο NATURA και οι προστατευόμενες περιοχές, GEODATA.  
: [http://geodata.gov.gr/geodata/index.php?option=com\\_sobi2&sobi2Task=sobi2Details&catid=18&sobi2Id=184&Itemid=](http://geodata.gov.gr/geodata/index.php?option=com_sobi2&sobi2Task=sobi2Details&catid=18&sobi2Id=184&Itemid=)
- Μπαέβας Θ. Ι. (2011) Προστασία του περιβάλλοντος, Περιφέρεια Βορείου Αιγαίου, Περιφερειακή Ενότητα Λήμνου.  
: <http://www.lemnos.gr/health/prostasia.htm>
- ΥΠΕΚΑ (2009) Ευρωπαϊκό οικολογικό δίκτυο NATURA 2000, Υπουργείο Περιβάλλοντος Ενέργειας και Κλιματικής Αλλαγής.  
: <http://www.ypeka.gr/Default.aspx?tabid=432>
- Campden (2012) Microorganism identification and characterization, Campden BRI, Food and Drink Innovation. UK.  
: <http://www.campdenbri.co.uk/services/microorganism-identification.php>
- Bergey (2013) Methods of classifying and identifying microorganisms, Pearson Education Inc  
: <http://classes.midlandstech.edu/carterp/Courses/bio225/chap10/lecture3.htm>

- Νίκας Κ. (2010) Τα ψάρια της Κάρλας, Άρθρα τοπικών εφημερίδων, Βόλος.  
: <http://nikaskostas.blogspot.gr/2010/05/blog-post.html>
- Χαραλαμπίδου Β. (1999) Σαράντα χρόνια μετά την εξαφάνιση της, η Κάρλα γίνεται και πάλι λίμνη, εφημερίδα «το Βήμα», Αθήνα.  
: <http://www.tovima.gr/relatedarticles/article/?aid=114215>
- Χριστόπουλος Α. (2013) Κάρλα: Δυναμική αναγέννηση της αποξηραθείσας λίμνης, Οϊωνός 37.  
: [http://www.ornithologiki.gr/page\\_cn.php?ID=2669&aID=1122](http://www.ornithologiki.gr/page_cn.php?ID=2669&aID=1122)
- ALPHA (1992) Algae, NCSU Water Quality Group, NC state university.  
: <http://www.water.ncsu.edu/watershedss/info/algae.html>
- Cavanilhac J. M. (2000) Marine Protozoa, Micscape Magazine,  
: <http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/indexmag.html> <http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/artmar01/protoz.html>
- World of Microbiology and Immunology (2003) *Dinoflagellates*., Encyclopedia.com.  
: <http://www.encyclopedia.com>
- Hoppenrath M. M., Saldarriaga J. F. (2012) Dinoflagellate, tree of life web project : <http://tolweb.org/Dinoflagellates/2445>.

## ABSTRACT

Lake Karla was an area of approximately 180 Km<sup>2</sup> before its desiccation in 1962. Over the last decade, different projects have been taken in the area for partially recreation of the lake and the implementation of this project has already begun. The new lake “Karla” will be approximately 38.000 Km<sup>2</sup>, therefore, it is a unique lake ecosystem for study in the genesis. In this case study, the seasonal variations in the qualitative composition of tiny eukaryotic micro organisms and cyanobacteria in the water column of Lake Karla, during November, December and January 2010/11. Besides the ever-changing water levels, the high volatility of the system recorded the significant variations in salinity (from 1 - 13 PSU). Furthermore, electron microscopy scanning was used in water samples that were stabled in the final concentration of 2.5% glutaraldehyde and diithithikan on PTFE membrane filters with a diameter of 0.2 mm in a vacuum low pressure ( $\leq$  100mm column Hg). The most abundant groups that were observed were cyanobacteria, algae and protozoa. The all-filamentous cyanobacteria were abundant in January and diatoms, evglinofyta and fungi were present in the samples of all three months. The morphological diversity of eukaryotic microorganisms was significantly higher than that of cyanobacteria. The formats that were identified in this case study will be identified with an inverted microscope and molecular analysis.

**Keywords:** Karla, scanning electron microscope, eukaryotes microorganisms.